Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Virologie
der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Leiter: Prof. Dr. med. W. Diefenthal und
Prof. Dr. med. K.–O. Habermehl

Untersuchungen über den Mitoseablauf und die DNA-Synthese nach Infektion mit Poliovirus und ME-Virus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Buchholz

aus Berlin

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0010

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Virologie
der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Leiter: Prof. Dr. med. W. Diefenthal und
Prof. Dr. med. K.–O. Habermehl

Untersuchungen über den Mitoseablauf und die DNA-Synthese nach Infektion mit Poliovirus und ME-Virus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Buchholz

aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. K.-O. Habermehl

Korreferent: Professor Dr. med. D. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 2. September 1974

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	Einleitung	5
II	Material und Methodik	7
III	Ergebnisse	15
1.	Mitosestimulation und DNA-Synthese-Hemmung Poliovirus-infizierter Zellen unter der Einwirkung von Virus-Inhibitoren	15
1.1.	Mitoseablauf in Poliovirus-infizierten Zellen unter dem Einfluß von 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB)	15
1.1.1.	Mitosestimulation in Poliovirus-infizierten Zellkulturen	15
1.1.2.	Hemmung der Poliovirus-Reproduktion in Abhängigkeit von der HBB-Konzentration	18
1.1.3.	Mitosestimulation Poliovirus-infizierter Gewebekulturzellen unter der Einwirkung von HBB	18
1.1.3.1.	Der Infektionsablauf bis zur 3. Stunde	2o
1.1.3.2.	Der Infektionsablauf bis zur 4. Stunde unter der Einwirkung von Colcemid	22
1.1.3.3.	Längerdauernde Einwirkung von HBB auf infizierte Zellkulturen	24
1.2.	DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellkulturen unter Guanidin	27
1.2.1.	Hemmung der Poliovirus-Reproduktion in Abhängigkeit von der Guanidin-Konzentration	28
1.2.2.	Nuclease-Wirkung auf die DNA fixierter Zellen	3o

		Seite
1.2.3.	Hemmung der DNA-Synthese nach Infektion mit Poliovirus unter Guanidin	31
1.2.4.	Hemmung der DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Guanidin-Konzentration	36
2.	DNA-Synthese und Mitose-Ablauf in Maus-Elberfeld (ME)-Virus-infizierten Zellkulturen	39
2.1.	Reproduktion von ME-Virus in L-Stammzellen	39
2.2.	Hemmung der DNA-Synthese in L-Stammzellen nach Infektion mit ME-Virus	41
2.3.	Mitosestimulation von HEp-2-Zellkulturen nach ME-Virus-Infektion	43
IV Diskussion		46
V Zusammenfassung		56
VI Literaturverzeichnis		58

I. Einleitung

Bei der Mehrzahl der apparent verlaufenden Virusinfektionen kommt es im Laufe der Virus-codierten Umstellung des Zellstoffwechsels zu funktionellen Störungen der Zelle, die zum cytopathischen Effekt und in ihrem Endstadium zum Zelltod führen können. Diese cytopathischen Veränderungen sind bei einer Vielzahl von Viruserkrankungen das pathologisch-morphologische Substrat des jeweiligen Krankheitsbildes.

Für die verschiedenen Wirt-Virus-Systeme bestehen erhebliche Unterschiede im Ablauf des Virus-Reproduktionszyklus. Darüberhinaus zeigt es sich, daß bereits vor Eintritt des Zellzerfalls sehr differenzierte funktionelle und morphologische Zellveränderungen als Folge von Virusinfektionen auftreten, die wesentlich von der Art des infizierenden Virus abhängen.

Selbst bei der Infektion mit einem kleinen, einfach aufgebauten Virus, dem Poliovirus, einem cytociden Picornavirus, das durch eine einsträngige RNA mit einem Molekulargewicht von nur 2×10^6 Dalton gekennzeichnet ist, lassen sich bis zum Einsetzen des Virus-induzierten Zellzerfalles eine Reihe von Zellveränderungen nachweisen, die theoretisch durchaus von pathogenetischer Bedeutung sein können. So kommt es in den frühen Stadien der Poliovirus-Reproduktion bis zum Auftreten Virus-spezifischer RNA-Polymerase zu Störungen der zelleigenen Protein- und Nukleinsäuresynthese und zu Änderungen im Mitose-Ablauf und zu Chromosomenbrüchen. Die Untersuchungen der frühen Stadien der Poliovirus-Reproduktion werden ermöglicht durch den Hemmeffekt von Guanidin auf den Virus-Reproduktionszyklus im Stadium der Virus-RNA-Synthese.

Ziel dieser Untersuchungen war es zu prüfen, ob die unter der Einwirkung von Guanidin in den frühen Stadien der Poliovirus-Infektion zu beobachtende Stimulation der Zellteilung auch unter der Einwirkung eines anderen Inhibitors der Virus-Reproduktion, dem 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB), bestätigt werden kann.

Im Zusammenhang mit der Zellteilung sollte die Virus-codierte Abschaltung der zellulären DNA-Synthese untersucht werden.

Weiterhin erhob sich die Frage, ob ein anderes Picorna-virus, das Maus-Elberfeld(ME)-Virus, das in seiner Struktur dem Poliovirus weitgehend gleicht, ähnliche Zellveränderungen induziert.

II. MATERIAL UND METHODIK

Nährmedien und Lösungen

Als Nährlösung zur Anzüchtung der Gewebekulturzellen und als Erhaltungsmedium während der Experimente wurden entweder Earlesche (34) oder Hanks'sche (62) Lösung unter Zugabe von Lactalbuminhydrolysat (NBCo) und Hefeextrakt (Yeastolate, Difco) in Endkonzentrationen von o,5 bzw. o,1 % verwendet, oder Minimal Essential Medium (MEM) nach Eagle (33) mit nicht-essentiellen Aminosäuren und Glutamin. Dieses Medium wurde in Pulverform bezogen (GBI), mit Aqua tridest aufgelöst und mit 1,8 g/l $NaHCO_3$ auf pH 7,2 eingestellt. Die Nährlösungen erhielten 5o E/ml Penicillin, 5o µg/ml Streptomycin und 25 IE/ml Mycostatin (Moronal). Alle Medien wurden mit Millipore-Filtern steril filtriert.
Zu den Medien wurde 1o % Kälberserum zugegeben, das mit einem Seitz-Filter EKS mit einem Überdruck von 1 atü steril filtriert worden war.
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,o wurde nach Dulbecco (31) angesetzt.
Trypsin 1:3oo (NBCo) wurde in einer Konzentration von o,2 % in PBS aufgelöst und mit einer n/1o Versen-Lösung (Äthylendiamintetraessigsäure) in einer Endkonzentration von 2,5 % versetzt, um eine gleichmäßige Suspension der Zellen bei der Passage zu erreichen. Diese Lösung wurde ebenfalls in einem Millipore-Filter sterilisiert.

Gewebekulturen

In dieser Arbeit wurden folgende permanente Zellstämme benutzt:
KB-Zellen, ein aus einem menschlichen, epidermalen Karzinom des Mundbodens isolierter Zellstamm (32),
HEp-2-Zellen, die aus einem menschlichen Karzinom des Larynx isoliert worden waren (92),
Fl-Zellen, aus menschlichem Amnion gewonnen (46), sowie
L-Stammzellen, die aus Mäuse-Fibroblasten hervorgegangen waren (1o2).

Alle Zellstämme wurden in Roux-Flaschen angezüchtet. Die Zellen wurden entweder in Earlescher Lösung mit Zusatz von Lactalbuminhydrolysat, Hefeextrakt und 10 % inaktiviertem (58°C, 30 Minuten) Kälberserum oder mit Eagles MEM mit Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum angezüchtet. Es wurden nur vollständig ausgewachsene Kulturen passagiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und je Flasche 20 ml Trypsin-Versen-Lösung bei 37°C aufgegeben. Nach etwa sechs Minuten wurden die Zellen durch leichtes Bewegen der Flaschen vom Glas abgelöst und sofort in Eis-gekühlte Zentrifugengläser gegeben. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation mit 50g für fünf Minuten sedimentiert und die überstehende Trypsinlösung abpipettiert. Das Zellsediment wurde in frischem, vorgewärmtem Nährmedium mit Zusatz von 10 % Kälberserum resuspendiert, dessen Volumen so bemessen war, daß aus einer Roux-Flasche drei neue angesetzt werden konnten. Für die Experimente und die Titerbestimmungen wurde die Zellsuspension in Plastik-Petrischalen von 6 cm Durchmesser (Falcon Plastics, California) einpipettiert. Für die Untersuchungen, bei denen Mitose-Zählungen vorgenommen werden sollten, war in die Petrischalen je ein Deckglas von 24 x 18 mm eingelegt. Für Radioaktivitätsmessungen wurden runde Deckgläschen mit 26 mm Durchmesser benutzt. Die Zellsuspension wurde in Petrischalen einpipettiert und diese in eine Begasungsanlage unter 5 % CO_2 in Luft, bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 36°C inkubiert (28). Je nach der Dichte der Zelleinsaat waren die Kulturen 24 oder 48 Stunden nach der Passage zu einem vollständigen, einschichtigen Zellrasen ausgewachsen und konnten für die Versuche verwendet werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Schale wurden die Zellen mit der Trypsin-Versen-Lösung abgelöst und in der Kammer nach Fuchs-Rosenthal gezählt.

Cytologische Technik

Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurden die Deckgläser mit den darauf haftenden Zellen entnommen und gründlich in PBS gewaschen, um Nährmedium- und Serumreste zu entfernen.

Danach wurden die Zellen in Formol-Alkohol (1 Teil 35 % Formol und 9 Teile absoluter Alkohol) 1o Minuten fixiert, dann durch die absteigende Alkohol-Reihe bis zum Aqua dest. gebracht. Die Deckgläschen wurden einmal kurz in kalte 1n HCl getaucht. Die zellulären Proteine wurden 1o Minuten lang bei 6o°C in 1n HCl hydrolysiert. Anschließend wurde die Feulgen-Färbung mit Schiffschem Reagenz für zwei Stunden durchgeführt, dreimal in SO_2-Wasser und 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden dann in der aufsteigenden Alkohol-Reihe entwässert, in Xylol gebracht und mit Caedax eingedeckt.
Zur Feststellung des Metaphase-Index wurden 3ooo Zellen je Präparat ausgezählt und die einzelnen Stadien des Mitosezyklus differenziert.

Virus

Für die hier durchgeführten Experimente wurden folgende Picornaviren verwendet:
a) Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney,
b) Maus-Elberfeld(ME)-Virus.

Poliovirus wurde in zwei bis drei Tage alten KB- bzw. Fl-Zellen vermehrt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und 2o ml Inokulum je Roux-Flasche aufgegeben. Bei KB-Zellen wurde das Inokulum mit Eaglescher bzw. Earlescher Lösung, bei Fl-Zellen mit Hanks'scher Lösung so verdünnt, daß die Infektionsmultiplizität 5o - 1oo Plaque-bildende Einheiten (pfu/Zelle) betrug. Nach einer Adsorptionszeit von 45 bis 6o Minuten bei 36°C wurde das Inokulum entfernt. Die Zellen wurden einmal mit Nährmedium gewaschen, je Roux-Flasche 6o ml Kulturmedium mit Zusatz von 1o % inaktiviertem Kälberserum zugegeben und bei 36°C inkubiert. Achtzehn Stunden nach der Virusinokulation zeigten die Zellen ausgeprägte cytopathische Veränderungen und hatten sich zum größten Teil von der Glaswand abgelöst. Die noch anhaftenden Zellen wurden mit Glasperlen abgelöst und zusammen mit dem überstehenden Medium bei -7o°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde diese Flüssigkeit fünf Minuten lang kräftig mit Glasperlen geschüttelt, um durch weitere

Zerstörung der Zellen Reste des darin befindlichen Virus freizusetzen. Anschließend wurde 1o Minuten lang bei 12oo g zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit wurde als Stammvirus verwendet und bei -7o°C gelagert.

Zur Herstellung von ME-Virus wurden in entsprechender Weise L-Stammzellen mit einem in MEM verdünnten Stammvirus (Infektionsmultiplizität 1oo pfu/Zelle) inokuliert. Nach der Adsorption wurde das Inokulum durch Eagles MEM mit Zusatz von 5 % inaktiviertem Kälberserum als Erhaltungsmedium ersetzt. Ernte und Reinigung des Virus erfolgten wie oben beschrieben.

Bestimmung des Virustiters

Die Konzentration von infektiösen Polioviruspartikeln wurde mit einer Plaque-Technik auf Einschicht-KB-Zellkulturen in Plastikpetrischalen bestimmt. ME-Virus wurde auf L-Stammzellen titriert.
Es wurden hierfür gut ausgewachsene, 2 Tage alte Kulturen mit je o,3 ml der zu untersuchenden Virusverdünnung inokuliert. Die Verdünnungen wurden in Zehnerpotenzstufen mit Eagles MEM ohne Zusatz von Kälberserum durchgeführt. Je Verdünnungsstufe wurden 2 Petrischalen benutzt. Nach einstündiger Adsorption des Virus an die Zellen bei 36°C in 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde das Inokulum abgesaugt und 3 ml eines Agar overlay aufgegeben, der 5 % inaktiviertes Kälberserum und o,7 % Agar (Difco agar purified) in Eagles MEM enthielt. Die Kulturen wurden bei 37°C in 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach drei Tagen wurde eine Vitalfärbung der durch den cytopathischen Effekt des Virus noch nicht abgestorbenen Zellen durch Überschichtung mit einer 1:4ooo in PBS verdünnten Neutralrot-Lösung durchgeführt. Etwa drei Stunden nach der Überschichtung hatten die lebenden Zellen den Farbstoff aufgenommen; die abgestorbenen Zellen blieben ungefärbt und waren als Plaques gut sichtbar. Die Anzahl der ausgezählten Plaques wurde auf Plaque-bildende Einheiten pro Milliliter (pfu/ml) berechnet.

Substanzen

1) N-Desacetyl-N-methylcolchicin (Colcemid, CIBA) wurde in einer Endkonzentration von 25 ng/ml, verdünnt in Eagles MEM verwendet.
2) Guanidin-Hydrochlorid (NBCo) wurde in nicht umkristallisiertem Zustand benutzt. Die Substanz wurde zunächst im Mörser unter vorsichtiger Zugabe von Eagles MEM aufgelöst. Nachdem Guanidin vollständig in Lösung gegangen war, wurde mit Eagles MEM auf die in den einzelnen Experimenten angegebene Endkonzentration aufgefüllt. Dieses Guanidin von NBCo und umkristallisiertes Guanidin ultrapure von MANN Research Lab. beeinflußten die Poliovirus-Reproduktion in gleicher Weise.
3) 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB) (Merck, Sharp and Dohme Research Lab., Rahway, USA) war in Earlescher Lösung schwer löslich, konnte jedoch durch mehrstündiges kräftiges Rühren bei 37°C fast vollständig in Lösung gebracht werden. Gegenüber der bekannten (108,110,112) schlechten Löslichkeit der hier verwendeten freien Base des HBB ist die auch selektiver wirksame D-Form des HBB-Hydrochlorids besser löslich (78).
4) DNase I (Serva, Heidelberg; 30000 Dornase E/mg) und RNase (NBCo; 40 Kunitz E/mg) wurden in einer Konzentration von 200 µg/ml verwendet.
5) 2-^{14}C-Thymidin (Radiochemical Centre, Amersham, England) hatte eine spezifische Aktivität von 35,9 mCi/mM (0,1 mCi/ml). Es wurden 0,77 bzw. 1,0 µCi Thymidin/Petrischale aufgegeben.

Isotopen-Markierung

Die Inkorporationsrate des radioaktiven Thymidins wurde mit einer Deckglasmethode untersucht (9). Die Zellkulturen wuchsen auf runden Deckgläschen, die in Petrischalen eingelegt waren. Das zur Anzüchtung benutzte Medium wurde nach zwei Tagen abgesaugt, die Zellkulturen dreimal mit 3 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und mit MEM nach Eagle ohne Kälberserumzusatz vorbehandelt. Nach der Vorbehandlung bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde das Medium abgesaugt und das

bei den einzelnen Versuchen angegebene Inokulationsmedium aufgegeben. Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurden 2 ml des entsprechenden Mediums mit o,77 bzw. 1,o µCi ^{14}C-Thymidin pro Gewebekultur aufpipettiert und die Kulturen 3o bzw. 4o Minuten inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen aus den Petrischalen entnommen und für 3o Minuten in +4°C kalte 5 %ige Trichloressigsäure (TCA) eingelegt. Nach Herauslösen des TCA-löslichen, nicht in die DNA inkorporierten Thymidins wurde mit 1o ml kalter TCA nachgespült. Bei Versuchen mit Poliovirus-infizierten Kulturen wurde nach der Elution des Säure-löslichen Materials eine Behandlung mit Formol-Alkohol für 1o Minuten angeschlossen.
Zur Radioaktivitätsmessung wurden die Deckgläschen in Aluminium-Schälchen geklebt, die in den Methan-Durchflußzähler der Firma Friesecke und Hoepfner paßten.

Nachweis der Spezifität des Thymidin-Einbaus in die DNA

Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Wirksamkeit der DNase

Die Spezifität des Einbaus von markiertem Thymidin in die DNA infizierter Zellen sollte durch anschließende DNase-Einwirkung nachgewiesen werden. In den wegen der hohen Infektiösität des Poliovirus mit Formaldehyd behandelten Zellen konnte die DNA nur in geringem Maße durch DNase abgebaut werden. Deshalb wurde in einer Versuchsreihe der Einfluß unterschiedlicher Fixierungsmittel auf den enzymatischen Abbau von zellgebundener DNA untersucht. Als Fixierungsmittel dienten:

FA: 1 Teil 35 %iges Formaldehyd + 9 Teile abs. Alkohol
A : 9 Teile abs. Alkohol + 1 Teil PBS
F : 1 Teil 35 %iges Formaldehyd + 9 Teile PBS
EA: 3 Teile Eisessig + 7 Teile abs. Alkohol
EAÄA: 1 Teil Eisessig + 1 Teil abs. Alkohol + 1 Teil Äther + 2 Teile Aceton

L-Stammzellen wurden 7o Minuten mit 5 ml Thymidin-freiem MEM vorbehandelt. Alle Schalen wurden dann mit je 1 µCi ^{14}C-Thymidin in 2 ml MEM 4o Minuten lang gepulst. Am Ende des Pulsintervalls wurden die Zellkulturen zehn Minuten lang mit je 5 ml

eines der angegebenen Fixierungsmittel behandelt und danach 5 mal für insgesamt 3o Minuten in PBS gewaschen; anschließend erfolgte während 3o Minuten die Behandlung mit 2,5 ml DNase I in einer Konzentration von 2oo µg/ml (9oooo Dornase E/mg) in PBS pH 7,1 bei Zimmertemperatur. Die Deckgläschen wurden eine Minute lang in 1o ml kalter PBS gewaschen. Das TCA-lösliche Thymidin wurde 3o Minuten lang in 1o ml 5 %iger kalter TCA eluiert. Als Kontrollen dienten gepulste und fixierte Kulturen ohne die Nuclease-Behandlung und unfixierte Kulturen mit bzw. ohne Nuclease-Behandlung. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie bereits beschrieben.

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Sie beschreibt die ^{14}C-Thymidin-Inkorporation in die TCA-unlösliche Fraktion mit und ohne nachfolgende DNase-Behandlung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Fixierungsmittels.

Ohne Fixation der Zellen tritt keine signifikante Nuclease-Einwirkung auf. Die Fixation mit 3,5 %igem Formaldehyd oder Formaldehyd-Alkohol verhindert die DNase-Wirkung. Die Wirkung von Alkohol allein als Fixierungsmittel ermöglicht eine deutliche Zunahme der DNase-Aktivität.
Maximale DNase-Aktivität zeigt sich nach Fixation mit Eisessig-Alkohol oder dem Fixierungsgemisch Eisessig-Alkohol-Äther-Aceton.

Fixierungsmittel	^{14}C-Thymidin-Inkorporation (Ipm)	
	ohne DNase	mit DNase
-	3399	3oo1
EA	3656	34
EAÄA	2667	56
FA	3193 +	2634
F	-	2896
A	-	283

Tab. 1: Radioaktivität (Impulse/Minute) ^{14}C-Thymidin-markierter Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Fixierungsmitteln, nachfolgender Behandlung mit DNase und anschließender TCA-Elution.
+: Ohne Elution des TCA-löslichen ^{14}C-Thymidins ergibt sich eine Inkorporationsrate von 4o51 Ipm.
-: Nicht durchgeführt.

Die Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in Säure-unlösliches und durch DNase abbaubares Material weist auf den spezifischen Einbau von Thymidin in die zelluläre DNA hin.

Der beschriebene Vorversuch zeigte, daß nach der Fixierung intakter Zellen mit Formaldehyd die zelluläre DNA für DNase nicht angreifbar ist. Es interessierte weiterhin, ob auch isolierte DNA nach Formaldehyd-Einwirkung für die DNase-Behandlung unzugänglich ist.

DNA aus Kälberthymus (570 µg/ml) wurde zehn Minuten lang bei 20°C mit ansteigenden Konzentrationen von Formaldehyd (0,35 - 17,5 %) behandelt. Die DNA wurde mit absolutem Alkohol gefällt, dreimal gewaschen und in PBS gelöst. Anschließend wurde sie zwei Stunden lang bei 37°C mit 200 µg/ml DNase inkubiert. Die DNA wurde in der Kälte durch 0,25 %iges Uranylacetat in 4 %iger Perchlorsäure gefällt. Das Sediment wurde abzentrifugiert, und die Extinktion des Überstandes bei 260 nm gegen eine nicht fixierte Kontrolle gemessen.

Es zeigte sich, daß die Formaldehyd-Behandlung nativer DNA die Abbaufähigkeit durch DNase nicht beeinflußt.

Diese Vorversuche zeigen, daß die DNA selbst durch die Formaldehyd-Behandlung nicht verändert wird. Die Fixierung durch Formaldehyd scheint dagegen zelluläre Strukturen, möglicherweise durch Denaturierung von Protein, so zu stabilisieren, daß die DNA durch DNase nicht angreifbar ist.

III. ERGEBNISSE

1. Mitosestimulation und DNA-Synthese-Hemmung Poliovirus-infizierter Zellen unter der Einwirkung von Virus-Inhibitoren

Zuerst wurde der Einfluß des Virus-Inhibitors 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB) auf die Poliovirus-induzierte Mitosestimulation untersucht.

1.1. Mitoseablauf in Poliovirus-infizierten Zellen unter dem Einfluß von 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB)

In den ersten Stunden einer Poliovirus-Infektion von Gewebekulturzellen kommt es zu einer Steigerung der Zellteilungsrate, die das Ausmaß der Mitosen nicht-infizierter Kontrollkulturen um mehr als 100 % übersteigen kann (59). Zur Klärung, ob unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen der gleiche Effekt auftrat, wurde der Metaphase-Index Poliovirus-infizierter Zellen nochmals in Stichproben untersucht.

1.1.1. Mitosestimulation in Poliovirus-infizierten Zellkulturen

Es wurden KB-Zellen verwendet, die in Petrischalen mit je einem eingelegten Deckgläschen zwei Tage lang in 6 ml MEM mit Zusatz von 10 % Kälberserum angezüchtet worden waren. Als Inokulations- und Nährmedium wurde bei diesem Versuch konditioniertes Medium verwendet. Es handelte sich um das ursprüngliche Kulturmedium, das zu Versuchsbeginn von den Gewebekulturen abgesaugt wurde. Die Infektion erfolgte mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney in einer Konzentration von $8{,}5 \times 10^7$ pfu/ml für eine Reihe und $1{,}7 \times 10^7$ pfu/ml für die andere (Infektionsmultiplizität 100 bzw. 20 pfu/Zelle). Zur Inokulation wurden die Kulturen mit je 2 ml der entsprechenden Virus-Konzentration in konditioniertem Medium überschichtet. Hierdurch wurde gewährleistet, daß die Zellen auch während des Versuches unter den gleichen Mediumbedingungen verblieben wie vor Versuchsbeginn. Nach 30 Minuten Adsorptionszeit wurde das Inokulationsmedium abgesaugt und durch 5 ml konditioniertes Nährmedium ersetzt. Die nicht-infizierten Kontrollkulturen erhielten gleiche Mengen konditioniertes Medium ohne Inokulum

und wurden in gleicher Weise weiterbehandelt. Zu den Untersuchungsterminen wurde je Reihe eine Schale entnommen und das darin liegende Deckgläschen histologisch aufgearbeitet.

Abbildung 1 stellt das Ergebnis dieser Untersuchung dar. Sie zeigt den Metaphase-Index von KB-Zellkulturen während des Infektionsablaufes. Im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollkulturen weisen die mit dem höheren Inokulum (1oo pfu/Zelle) infizierten Zellen drei und vier Stunden nach Infektionsbeginn eine Steigerung der Zellteilung um rund 1oo % auf. Bei der niedrigen Infektionsmultiplizität (2o pfu/Zelle) ist die Zellteilungsrate nicht so deutlich gesteigert. Die Ergebnisse wurden im χ^2-Test miteinander verglichen. Dieser Test gibt die Wahrscheinlichkeit p(= probability) an, mit der zwei Meßpunkte sich signifikant unterscheiden. Als statistisch gut gesichert gilt eine Differenz mit einem $p<o,oo27$ (entsprechend der 3s-Regel beim Mittelwertvergleich).
Nach diesem Kriterium besteht zwischen der Zellteilungsrate der Kontrollkulturen und der mit der niedrigen Infektionsmultiplizität infizierten Zellen keine signifikante Differenz ($p= o,o65$ zur 3. Stunde und $p= o,17$ zur 4. Stunde). Die Differenz zwischen den Kontrollkulturen und den mit der hohen Infektionsmultiplizität infizierten Zellen ist dagegen signifikant ($p= o,ooooo9$ zur 3. Stunde und $p= o,oooo7$ zur 4. Stunde).
Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur (59) überein. Es zeigt, daß das verwendete Wirt-Virus-System für die folgenden Untersuchungen geeignet ist.

In einem zweiten Vorversuch mußte untersucht werden, ob 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB) in diesem Zellsystem ein geeigneter Inhibitor der Poliovirus-Replikation ist.

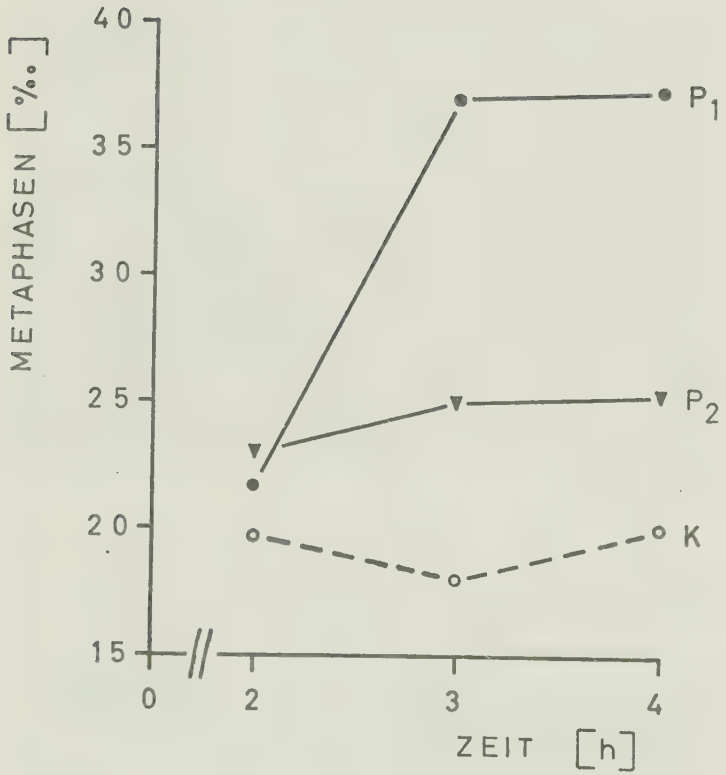

Abb. 1: Mitosestimulation in KB-Zellkulturen nach Infektion mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney in Abhängigkeit von der Infektionsmultiplizität (P_1 = 1oo pfu/Zelle und P_2 - 2o pfu/Zelle).

1.1.2. Hemmung der Poliovirus-Reproduktion in Abhängigkeit von der HBB-Konzentration

Es wurden KB-Zellkulturen verwendet, die drei Tage lang in 6 ml Gewebekulturmedium unter Zusatz von 10 % Kälberserum in Petrischalen (etwa 2 x 10^6 Zellen/Schale) angezüchtet worden waren. Je eine Gewebekulturschale wurde mit 2 ml der zu prüfenden HBB-Konzentration in Gewebekulturmedium 2,5 Stunden vorbehandelt. Zur Inokulation wurden 1,6 x 10^7 pfu/Schale in 2 ml MEM aufgegeben. Dies entspricht einer Infektionsmultiplizität von 8 pfu/Zelle. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde das Inokulationsmedium abgesaugt, jede Schale dreimal mit je 2 ml Medium gewaschen, dann zur Elution des nicht fest adsorbierten Virus 2 ml Medium aufgegeben und die Kulturen für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 2 ml Medium wurden sie dann mit 3 ml Nährmedium bis zum Erntetermin, acht Stunden nach Infektionsbeginn, inkubiert. Vorbehandlung, Inokulation, Waschvorgänge und Aufgabe der Elutions- und Nährmedien erfolgten unter Zugabe jeweils gleicher HBB-Konzentrationen. HBB wurde in Konzentrationen zwischen 11 µM (2,5 µg/ml) und 313 µM (70 µg/ml) untersucht. Zur Kontrolle wurden infizierte Gewebekulturen ohne Inhibitor in gleicher Weise behandelt. Das in das überstehende Gewebekulturmedium freigesetzte Virus wurde in KB-Monolayern titriert.

Das Ergebnis dieses Dosiswirkungsversuches ist in Abb. 2 dargestellt. Sie zeigt die Virusreproduktion acht Stunden nach Infektionsbeginn in Abhängigkeit von der HBB-Konzentration. Gegenüber den nicht mit dem Inhibitor behandelten Kontrollkulturen wird die Produktion von Poliovirus Typ I mit steigenden HBB-Konzentrationen gehemmt. Selbst 250 µM (55 µg/ml) HBB bewirken jedoch nur eine Hemmung der Virusreproduktion um 97,7 %. Das Ausmaß dieser Hemmung stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten (108, 110, 112) überein. Deshalb ist diese Substanz in diesem Wirt-Virus-System für die geplanten Versuche geeignet.

1.1.3. Mitosestimulation Poliovirus-infizierter Gewebekulturzellen unter der Einwirkung von HBB

Die beiden Vorversuche zeigten, daß
1. im Poliovirus-KB-Zell-System die in der Literatur

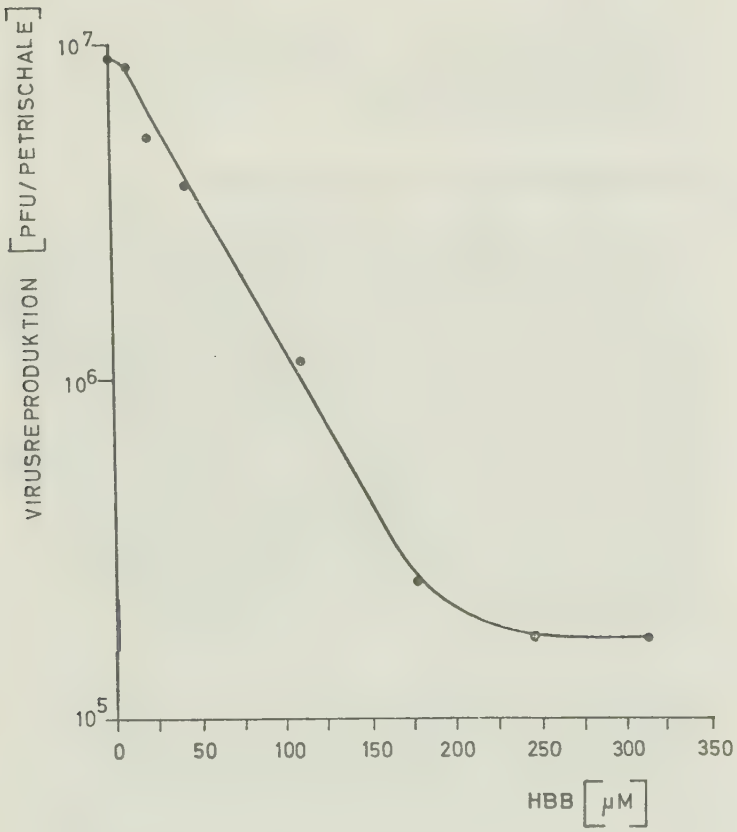

Abb. 2: Reproduktion von Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney nach acht-stündigem Infektionsablauf in KB-Zellkulturen unter Einwirkung steigender Konzentration von HBB. Freisetzung von Viruspartikeln in den Überstand (pfu/Petrischale).

beschriebene Mitosestimulation auftritt und
2. HBB als Inhibitor der Poliovirus-Replikation im KB-Zell-System bei Infektionen mit Poliovirus Typ I wirksam ist.
Darauf aufbauend sollte die Poliovirus-induzierte Mitosestimulation im KB-Zell-System unter dem Einfluß von HBB untersucht werden.

1.1.3.1. Der Infektionsablauf bis zur 3. Stunde

Die Infektion von KB-Zellen erfolgte mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney in einer Konzentration von etwa 1×10^8 pfu/ml in MEM ohne Kälberserum. Zur Inokulation wurden die Gewebekulturen in den Schalen ohne Vorbehandlung mit jeweils 2 ml überschichtet (Infektionsmultiplizität etwa 100 pfu/Zelle). Während das Inokulum einer Reihe gleichzeitig einen Zusatz von 178 µM HBB enthielt (Reihe PH), blieb eine zweite Reihe infizierter Kulturen unbehandelt (Reihe P). Zur Kontrolle wurden zwei Reihen nicht-infizierter Zellen mit 2 ml MEM mit (Reihe H) bzw. ohne (Reihe K) Inhibitorzusatz inkubiert. Nach 30 Minuten Adsorptionszeit wurde das Inokulationsmedium aller vier Schalen abgesaugt und durch 4 ml Nährmedium mit bzw. ohne HBB-Zusatz ersetzt. Zu den Untersuchungsterminen wurde je Reihe ein Deckgläschen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, liegt die hier verwendete HBB-Konzentration von 178 µM im unteren Bereich des exponentiellen Abfalles der Dosiswirkungskurve.

Dargestellt ist in Abb. 3 der Metaphase-Index von KB-Zellen in Abhängigkeit von der Infektionsdauer. Drei Stunden nach Infektionsbeginn ist die Zellteilungsrate in infizierten Zellen annähernd doppelt so groß wie in den entsprechenden Kontrollen. Zur 2. bis 3. Stunde ist die Mitosestimulation in infizierten Zellen (Reihe P) gegenüber den Kontrollkulturen mit $p < 0{,}0001$ signifikant erhöht. Diese Poliovirus-induzierte Steigerung der Zellteilungsrate wird durch HBB nur geringfügig, statistisch nicht signifikant gehemmt; die Differenz der Metaphase-Indices ist jedoch gegenüber den Kontrollkulturen mit $p < 0{,}0001$ signifikant. HBB (178 µM/ml) verändert in den Kontrollkulturen den Metaphase-Index nicht signifikant.

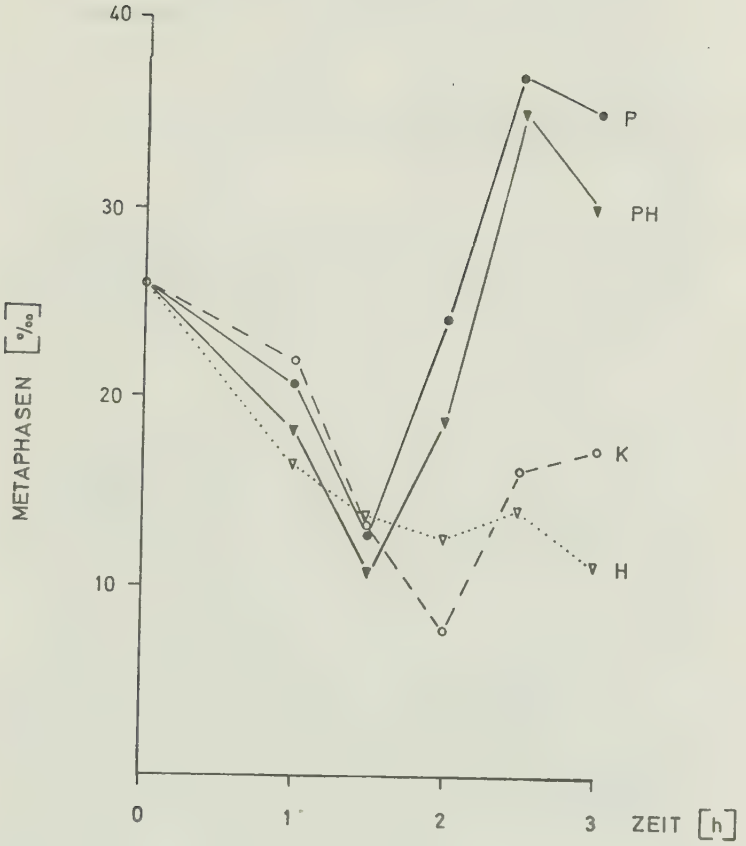

Abb. 3: Metaphase-Index von KB-Zellkulturen nach Infektion mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney (Infektionsmultiplizität 100 pfu/Zelle) unter Einwirkung von 178 µM HBB (Reihe PH) bzw. ohne Inhibitor (Reihe P). Nicht-infizierte Kontrollkulturen mit (Reihe H) bzw. ohne (Reihe K) HBB-Zusatz.

Dieser Versuch zeigt, daß die unter der Einwirkung von HBB noch ablaufenden frühen Stadien der Poliovirus-Reproduktion ausreichen, um den für dieses Virus charakteristischen Effekt der Mitosestimulation auszulösen.

1.1.3.2. Der Infektionsablauf bis zur 4. Stunde unter der Einwirkung von Colcemid

Im vorhergehenden Versuch wurden in Stichproben die Metaphasen zu bestimmten Zeiten des Infektionsablaufes ausgezählt. Mit dieser Versuchsanordnung wurde nur der Metaphase-Index - Metaphasen/ausgezählte Zellen (°/oo) - zu den verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung erfaßt.
Damit konnte nicht ausgeschlossen werden, daß das Ergebnis durch die Mitosedauer beeinflußt wird.
Um zu klären, ob die Poliovirus-induzierte Stimulation der Metaphaserate nur durch eine verlängerte Mitose vorgetäuscht wird, wurde ein gleichartiger Versuchsansatz unter Zugabe von Colcemid durchgeführt. Dieses Colchicin-Derivat arretierte in der gewählten Konzentration von 25 ng/ml alle sich teilenden Zellen in der Metaphase (59), ohne daß die zelluläre DNA-Synthese und der Metaphase-Index beeinflußt werden. Beobachtungen an KB-Zellen zeigten, daß die Einwirkung von Colchicin in einer Konzentration von 4o ng/ml über mehrere Stunden keinen meßbaren Effekt auf die DNA-Synthese hat (113). Auch Colchicin-Konzentrationen von loo - looo ng/ml vermindern über zwölf Stunden nicht die DNA-Synthese und den Mitose-Index in PHA-stimulierten menschlichen Lymphocyten (45).

Die Inokulation von KB-Zellen erfolgte mit Poliovirus in einer Konzentration von 2 x 10^7 pfu/ml in MEM mit Zusatz von 10 % Kälberserum (Infektionsmultiplizität 2o pfu/Zelle). Sämtliche Inokulations- und Nährmedien enthielten 25 ng/ml Colcemid. Ein Teil der Petrischalen enthielt außerdem 176 µM HBB. Nach 3o Minuten Adsorptionszeit wurden die Inokula-

tionsmedien abgesaugt und 4 ml der entsprechenden Nährmedien aufgegeben. Vier Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellen histologisch aufgearbeitet. Als Kontrolle dienten gleichbehandelte nicht infizierte Kulturen.

HBB	arretierte Metaphasen (‰)	
	nicht infiziert	Poliovirus infiziert
ø	3o,3 +)	121,7
176 µM	69,3	118,o

Tab. 2: Metaphase-Index in KB-Zellkulturen nach vierstündiger Infektion mit Poliovirus (2o pfu/Zelle) in Anwesenheit von Colcemid (25 ng/ml) bei gleichzeitiger Behandlung mit 176 µM HBB.

+) ohne Colcemid-Zusatz ergibt sich zu Versuchsbeginn ein Metaphase-Index von 3o,3 ‰.

Der Metaphase-Index in Tabelle 2 erfaßt sämtliche Zellen, die während des vierstündigen Infektionsablaufes in die Mitose eingetreten sind. Der Vergleich der Metaphase-Indices im χ^2-Test zeigt, daß die Zellteilungsrate in Poliovirus-infizierten KB-Zellen signifikant gesteigert ist ($p = o,ooooo45$). Durch die Behandlung mit Colcemid wird bewiesen, daß die Poliovirus-Infektion zu einer echten Vermehrung der Mitosen in KB-Zellkulturen führt. Das Ergebnis bestätigt außerdem signifikant ($p = o,oooo1$), daß die Mitosestimulation in den Poliovirus-infizierten Kulturen auch dann auftritt, wenn der Infektionsablauf durch HBB unterbrochen wird.

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, daß die Poliovirus-induzierte Stimulation der Zellteilung auch dann auftritt, wenn die Virus-Reproduktion durch den Inhibitor HBB unterbrochen wurde.
In diesen Versuchen wurden nur relativ frühe Stadien der Poliovirus-Replikation und ihr Einfluß auf die Zellteilungsrate untersucht.
Das folgende Experiment sollte die Wirkung einer

länger dauernden Einwirkung des Inhibitors auf die Poliovirus-beeinflußte Zellteilungsrate von KB-Zellen klären.

1.1.3.3. Längerdauernde Einwirkung von HBB auf infizierte Zellkulturen

Die während des Infektionsablaufes in die Mitose eintretenden Zellen wurden wiederum durch 25 ng/ml Colcemid in der Metaphase arretiert. Um auszuschließen, daß Zellen durch eine längerdauernde Colcemid-Behandlung geschädigt werden, wurden drei aufeinanderfolgende Untersuchungsintervalle von je sieben Stunden gewählt, in denen die sich teilenden Zellen durch Colcemid in der Metaphase arretiert wurden.

Das Prinzip der Versuchsanordnung ist aus dem Schema der Abb. 4 ersichtlich. Zunächst wurden die Kulturen mit HBB vorbehandelt, um bereits zum Zeitpunkt der Virus-Inokulation eine ausreichende Inhibitor-Konzentration in der Zelle zu gewährleisten. Zur Inokulation und im Nährmedium wurde HBB in einer Konzentration von 179 µM verwendet. Alle Kulturen, mit Ausnahme einer unbehandelten Kontrollkultur, die schon vor Versuchsbeginn histologisch aufgearbeitet wurde (Nr. 1 in Abb. 4), wurden zwei Stunden lang mit 3 ml HBB in MEM mit 10% Kälberserum vorbehandelt. Die Inokulation von KB-Zellen erfolgte zum Zeitpunkt 0 mit Poliovirus Typ_8 I, Stamm Mahoney in einer Konzentration von $1{,}4 \times 10^6$ pfu/ml unter Zusatz von HBB. Je Schale wurden 2 ml Inokulationsmedium verwendet (Infektionsmultiplizität 100 pfu/Zelle) (Nr. 3 und 8 in Abb. 4).

Die Schale, die zur Zählung der während des 1. Untersuchungsintervalles arretierten Metaphasen verwendet werden sollte (Nr. 8), enthielt im Inokulationsmedium 25 ng/ml Colcemid. Nicht-infizierte Kontrollkulturen wurden ebenso mit (Nr. 7) bzw. ohne (Nr. 2) Colcemid-Zusatz inkubiert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wurde das Inokulum abgesaugt und durch 5 ml Nährmedium ersetzt. Das Nährmedium enthielt HBB und in den Schalen, in denen die im 1. Untersuchungsintervall arretierten Metaphasen bestimmt werden sollten, zusätzlich Colcemid. Nach sieben Stunden wurde die Inkubation der infizierten (Nr. 3 und 8) bzw. nicht-infizierten (Nr. 2 und 7) und Colcemid-behandelten (Nr. 7 und 8) bzw. unbehandelten (Nr. 2 und 3) Kulturen des ersten Untersuchungsintervalles beendet und die Deckgläschen histologisch aufgearbeitet.

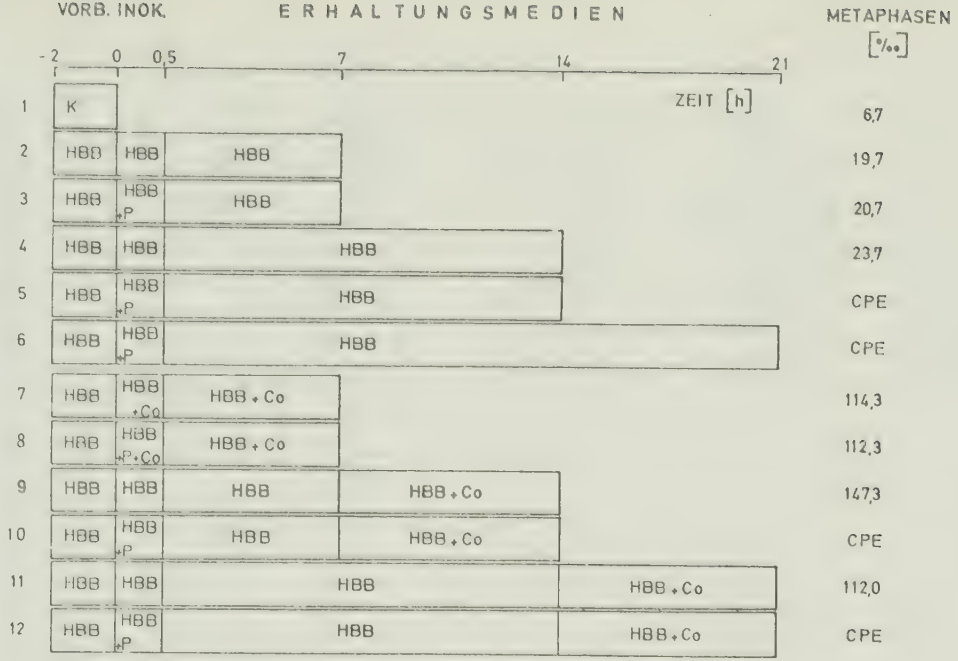

Abb. 4: Behandlungsschema und Metaphase-Index in KB-Zellkulturen nach Infektion (+P) mit Poliovirus (100 pfu/Zelle) und unterschiedlicher Einwirkungsdauer von 179 µM HBB. Arretierung der in die Mitose eintretenden Zellen in der Metaphase durch 25 ng/ml Colcemid (+ Co) während dreier aufeinanderfolgender sieben-stündiger Intervalle.

Zur Zählung der während des 2. Untersuchungsintervalles angefallenen Metaphasen wurde das Nährmedium je einer infizierten (Nr. 10) und nicht-infizierten (Nr. 9) Zellkultur sieben Stunden nach Inokulationsbeginn gegen ein Colcemid-haltiges Medium gewechselt. 14 Stunden p.i. wurde die Inkubation dieser Kulturen und je einer infizierten (Nr. 5) und nicht-infizierten (Nr. 4) Kultur, die ohne Wechsel des Nährmediums bis dahin inkubiert worden waren, beendet.

Gleichzeitig wurde zur 14. Stunde zur Untersuchung des 3. Intervalles das Nährmedium von einer infizierten (Nr. 12) und einer nicht-infizierten (Nr. 11) Kultur abgesaugt und gegen 5 ml Colcemid-haltiges Medium ersetzt. 21 Stunden nach Inokulationsbeginn wurden diese Kulturen und eine infizierte Kontrollkultur, die ohne Wechsel des Nährmediums inkubiert worden war (Nr. 6), histologisch aufgearbeitet.

Neben dem Behandlungsschema ist in dem Versuchsplan der Abb. 4 der entsprechende Metaphase-Index angegeben. Die Metaphase-Indices in den Untersuchungsreihen 1 - 4 zeigen ebenso wie die in den Reihen 7 - 9 und 11 physiologische Schwankungen der Zellteilungsrate in KB-Zellkulturen (s. auch Abb. 3).

Diese Untersuchungsreihen zeigen, daß auch eine längerdauernde HBB-Behandlung bis zu 23 Stunden keinen Einfluß auf die Zellteilungsrate nicht-infizierter Zellen hat. Dieser Effekt wird sowohl im Stichprobenversuch (in der oberen Hälfte des Schemas), als auch bei der Kumulation der Metaphasen durch Colcemid (in der unteren Hälfte des Schemas) deutlich. Sieben Stunden nach Infektionsbeginn zeigen Poliovirus-infizierte KB-Zellen unter HBB gleiche Zellteilungsraten wie ihre Kontrollkulturen, was aus dem Vergleich der Metaphaseraten in den Untersuchungsreihen 2 und 3 bzw. 7 und 8 deutlich wird.

Ursache dessen könnte ein Rückgang der Metaphaserate in den späten Infektionsstadien sein, der dadurch die vorangegangene Stimulation (s. Abb. 3 und Tab. 2) aufhebt und so die gesamte Metaphaserate in infizierten Zellkulturen wieder auf das Niveau der Kontrollkulturen bringt. Möglicherweise wird dieser Effekt nur deshalb

deutlich, weil unter HBB - wie die Untersuchungsreihen 3 und 8 zeigen - die Ausbildung eines CPE in infizierten Zellen über die 7. Stunde hinaus verzögert wird. HBB verhindert jedoch nicht, daß 14 Stunden p.i. ein deutlicher CPE besteht (Reihen 5, 6, 1o und 12).

Die Ergebnisse dieses ersten Abschnittes zeigten, daß die durch frühe Stadien der Poliovirus-Infektion ausgelöste Mitosestimulation auch unter HBB auftritt. Da HBB den Infektionsablauf nur gering verzögert und außerdem die Reproduktion von infektiösen Partikeln nur um zwei Zehnerpotenzen vermindert, ist HBB als ein relativ schwacher Inhibitor anzusehen

Ein stärkerer Inhibitor der Reproduktion von Poliovirus Typ I ist Guanidin. Es bewirkt, daß der CPE in infizierten Zellen wesentlich später auftritt und daß die Reproduktion von infektiösen Viruspartikeln geringer ist als unter HBB. Die Metaphasestimulation in den frühen Stadien der Poliovirus-Infektion tritt aber auch unter Guanidin auf (56). Diese Substanz wird in den folgenden Untersuchungen als Inhibitor verwendet.

1.2. DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellkulturen unter Guanidin

Da ein enger Zusammenhang zwischen DNA-Synthese und nachfolgender Mitose in nicht-infizierten Gewebekulturen besteht, sollte auch in Poliovirus-infizierten Zellen nach den Untersuchungen des Mitoseablaufes jetzt der Verlauf der DNA-Synthese verfolgt werden.

Um sicherzustellen, daß in den hier verwendeten HEp-2-Zellen die Poliovirus-Replikation durch Guanidin in der bekannten Weise gehemmt wird, und um die optimale Inhibitor-Konzentration zu ermitteln, wurde ein Dosiswirkungsversuch vorangestellt.

1.2.1. Hemmung der Poliovirus-Reproduktion in Abhängigkeit von der Guanidin-Konzentration

HEp-2-Gewebekulturzellen wurden in Petrischalen angezüchtet. Zur Infektion wurden 2 ml Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney in MEM mit einer Konzentration von $2{,}64 \times 10^8$ pfu/ml (Infektionsmultiplizität 250 pfu/Zelle) verwendet. Nach 35 Minuten Adsorptionszeit wurde das Inokulationsmedium abgesaugt, jede Schale zweimal mit je 2,5 ml MEM mit 10 % Kälberserum gewaschen, dann 3 ml Medium aufgegeben, für weitere 45 Minuten inkubiert und, nachdem nicht adsorbiertes Virus eluiert worden war, erneut einmal mit 2 ml Medium gewaschen. Die Kulturen erhielten dann 3 ml Nährmedium und wurden 22 Stunden lang, bis zum Erntetermin, inkubiert. Das in den Überstand freigesetzte Virus wurde in HEp-2-Monolayer-Gewebekulturen titriert. Je eine Gewebekulturschale wurde mit den zu prüfenden Guanidin-Konzentrationen (0,5 - 2,6 mM) in 3 ml Nährmedium 2,5 Stunden vorbehandelt. Auch die für die Inokulation und Waschvorgänge verwendeten Nährmedien enthielten die entsprechenden Guanidin-Konzentrationen. Als Kontrollen dienten infizierte Gewebekulturen ohne Inhibitorzusatz.

Die Abhängigkeit der Reproduktion und Freisetzung infektiöser Poliovirus-Partikel von der Guanidin-Konzentration ist in Abb. 5 dargestellt. Mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen wird die Reproduktion von reifem Virus gehemmt. Bei 2,1 mM (200 µg/ml) erfolgt eine Hemmung um 99,9992 %, entsprechend fünf Zehnerpotenzen. Diese Hemmung stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten (26,27,81) überein. Sie zeigt, daß das hier verwendete Wirt-Virus-System für die folgenden Untersuchungen geeignet ist. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Guanidin-Konzentration von 2,6 mM gewählt. Sie gewährleistet eine maximale Hemmung der Virus-Reproduktion.

Nachdem in diesem Vorversuch für das verwendete Wirt-Virus-System die Wirksamkeit und optimale Konzentration von Guanidin festgestellt worden war, sollte jetzt der Einfluß des Guanidins auf die DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten HEp-2-Zellen untersucht werden.

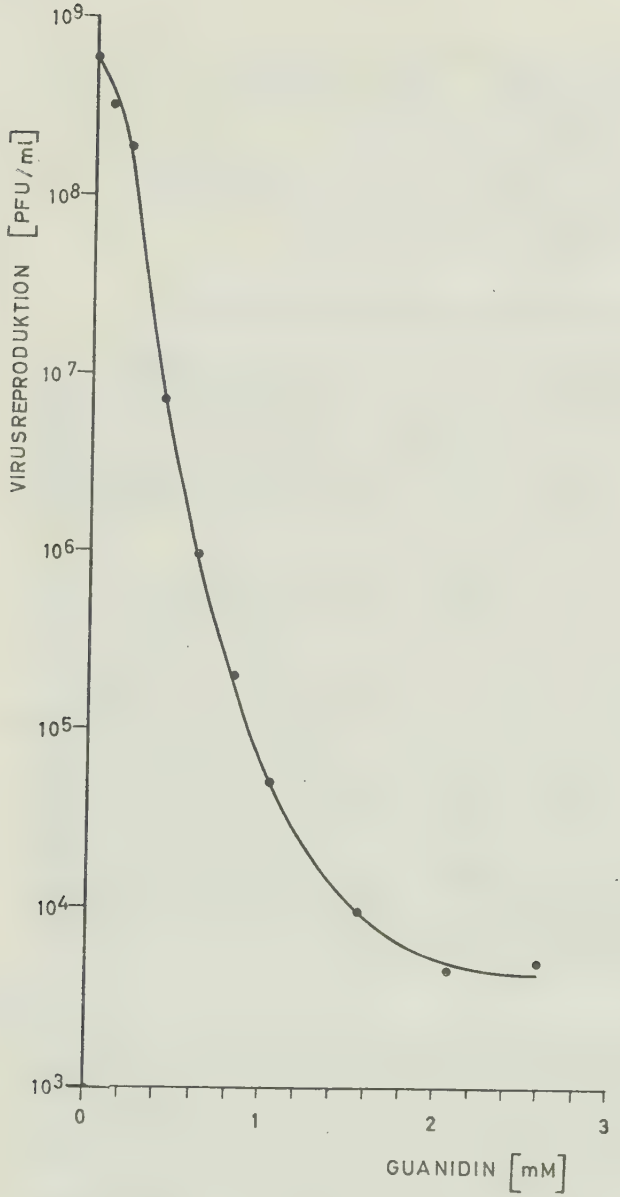

Abb. 5: Reproduktion von Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney nach 22-stündigem Infektionsablauf in HEp-2-Kulturen unter Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Guanidin. Freisetzung von Viruspartikeln in den Überstand (pfu/ml).

Als Maß für die DNA-Synthese der Zellen wurde in den folgenden Versuchen der Säure-unlösliche ^{14}C-Thymidin-Einbau angesehen. Um sicherzustellen, daß es sich um einen spezifischen Thymidin-Einbau in die zelluläre DNA handelte, wurde die Wirksamkeit spezifischer Nucleinsäure-spaltender Enzyme auf den ^{14}C-Thymidin-Gehalt fixierter Zellen untersucht.

1.2.2. Nuclease-Wirkung auf die DNA fixierter Zellen

Auf Deckgläschen in Petrischalen in MEM angezüchtete HEp-2-Zellkulturen wurden mit 2,5 ml Poliovirus (3,25 x 10^8 pfu/ml bzw. 4oo pfu/Zelle) inokuliert. Das Inokulationsmedium enthielt einen Guanidin-Zusatz von 2,6 mM (PG). Zur Kontrolle wurden eine Reihe ohne Guanidin infiziert (Reihe P) und je eine Reihe nicht-infizierter Zellkulturen mit (Reihe G) bzw. ohne (Reihe K) Inhibitor-Zusatz inokuliert. Nach einer Adsorptionszeit von 3o Minuten wurde das Inokulum durch 5 ml Nährmedium mit bzw. ohne Guanidin-Zusatz ersetzt. Zur 4. Stunde nach Inokulationsbeginn wurden drei Kulturschalen je Reihe, zur 7. Stunde je eine Kulturschale mit je o,77 µCi ^{14}C-Thymidin in 2 ml des Nährmediums mit bzw. ohne Guanidin-Zusatz 3o Minuten lang gepulst. Danach wurden die Kulturen bei 2o°C zehn Minuten lang in 1o ml Eisessig-Alkohol (3:7) fixiert und danach fünfmal für insgesamt 3o Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte für 3o Minuten bei 37°C die Nuclease-Behandlung: je eine Schale jeder Reihe erhielt RNase bzw. DNase I in einer Konzentration von 2oo µg/ml in je 5 ml PBS. Die Kontrollen wurden nur mit PBS behandelt. Die Säure-löslichen Bestandteile der Zellen wurden danach 4o Minuten lang in 1o ml 5 %iger kalter TCA eluiert, kurz mit kalter TCA gespült, für zehn Minuten mit 1o %igem Formol-Alkohol behandelt, die Deckgläschen auf Aluminiumschälchen geklebt und getrocknet. Nach dem zweiten Puls-Intervall nach 7,5 Stunden wurde zur Kontrolle nur die Inkorporationsrate bestimmt und auf die Nuclease-Behandlung verzichtet.

Tabelle 3 zeigt, daß die ^{14}C-Thymidin-Aktivität der Säure-unlöslichen Fraktion der Zellen aller Untersuchungsreihen auch durch die hohe RNase-Konzentration nicht vermindert wird. Dagegen wird das gesamte ^{14}C-Thymidin durch die DNase-Behandlung in eine Säure-lösliche Form überführt. Das bedeutet, daß das ^{14}C-Thymidin zuvor spezifisch in die DNA der Zellen eingebaut worden ist.

Untersuchungstermin (Stunden)	Nuclease-Behandlung	^{14}C-Thymidin-Inkorporation (Ipm) in den Kulturreihen			
		K	G	PG	P
4,5	-	24oo	1365	798	372
4,5	RNase	17o2	1433	784	414
4,5	DNase	22	19	12	1o
7,5	-	2411	1631	62o	138

Tab. 3: ^{14}C-Thymidin-Inkorporation in die TCA-unlösliche Fraktion von Poliovirus-infizierten, Guanidin-behandelten (Reihe PG) bzw. unbehandelten (Reihe P) Zellkulturen nach anschließender Behandlung mit RNase bzw. DNase. Nicht-infizierte Kontrollkulturen unter Einwirkung von 2,6 mM Guanidin (Reihe G) bzw. ohne Inhibitor (Reihe K).

1.2.3. Hemmung der DNA-Synthese nach Infektion mit Poliovirus unter Guanidin

Bei einer Poliovirus-Infektion wird neben der Mitosestimulation (59) auch eine Abschaltung der DNA-Synthese beobachtet (1, 73, 79). Diese beiden anscheinend gegensätzlichen Phänomene werden in den frühen Phasen der Virus-Infektion ausgelöst.

Wird die Poliovirus-Infektion durch einen Inhibitor während dieser Phase gehemmt, so ist - wie die im Abschnitt 1.1. beschriebenen Versuche zeigen - die Metaphase-Stimulation in den Zellkulturen trotzdem weiter zu beobachten.

Nachdem in den beiden Vorversuchen die optimale Guanidin-Konzentration und die Spezifität der Thymidin-Inkorporation in die DNA untersucht worden waren, sollte in den folgenden Versuchen die DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellen unter dem Einfluß dieses Inhibitors beobachtet werden.

Auf runden Deckgläschen in Petrischalen gleichmäßig dicht angewachsene HEp-2-Gewebekulturzellen wurden mit Poliovirus in einer Konzentration von 6,5 x 10^6

pfu/ml inokuliert und 2 ml Inokulum je Schale aufgegeben. Die eine Hälfte der Petrischalen erhielt 2,6 mM Guanidin, die andere blieb unbehandelt. Nach einer Adsorptionszeit von 3o Minuten wurde das Inokulum durch 5 ml Nährmedium mit bzw. ohne Inhibitor-Zusatz ersetzt. Als Kontrollen dienten zwei Reihen nicht-infizierter Kulturen mit bzw. ohne Guanidin-Behandlung. Zu den Untersuchungsterminen wurde eine Kultur je Reihe mit o,77 µCi ^{14}C-Thymidin 3o Minuten gepulst. Das ^{14}C-Thymidin war in Medium mit bzw. ohne Guanidin-Zusatz verdünnt. Fiel der Pulsungstermin in die Inokulationszeit, so erfolgte die Verdünnung in dem entsprechenden Inokulationsmedium. Am Ende des Puls-Intervalles wurden die Deckgläschen entnommen, 3o Minuten mit 5%iger TCA das nicht in die DNA eingebaute ^{14}C-Thymidin eluiert, kurz mit kalter TCA nachgespült und 1o Minuten in 1o%igem Formol-Alkohol fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in Alumiumschälchen geklebt und zur Messung der Radioaktivität getrocknet.

Abbildung 6 zeigt die DNA-Synthese Poliovirus-infizierter Zellkulturen unter dem Einfluß von Guanidin und ihrer entsprechenden Kontrollen während des Infektionsablaufes. Die DNA-Synthese nicht-infizierter, nicht-Guanidin-behandelter HEp-2-Zellkulturen (K) bleibt über den beobachteten Zeitraum - von methodischen Schwankungen abgesehen - konstant. Unter Guanidin ist die Thymidin-Inkorporation nicht-Poliovirus-infizierter Kontrollkulturen (G) um 35 % vermindert.

In Poliovirus-infizierten Zellen dagegen fällt die DNA-Synthese zwei Stunden nach Infektionsbeginn ab. Sie ist sechs Stunden p.i. um 95 % gegenüber den Kontrollkulturen vermindert.

Diese Abschaltung findet auch nach Hemmung des Infektionsablaufes durch Guanidin statt. Sie ist aber etwas geringer als in den nicht-behandelten, infizierten Zellkulturen.

In der ersten Stunde der Infektion liegt die DNA-Synthese der Poliovirus-infizierten Zellkulturen über dem entsprechenden Wert der Kontrollkulturen. Ob es sich dabei um eine echte Steigerung der DNA-Synthese in den frühesten Infektionsstadien handelt oder nur

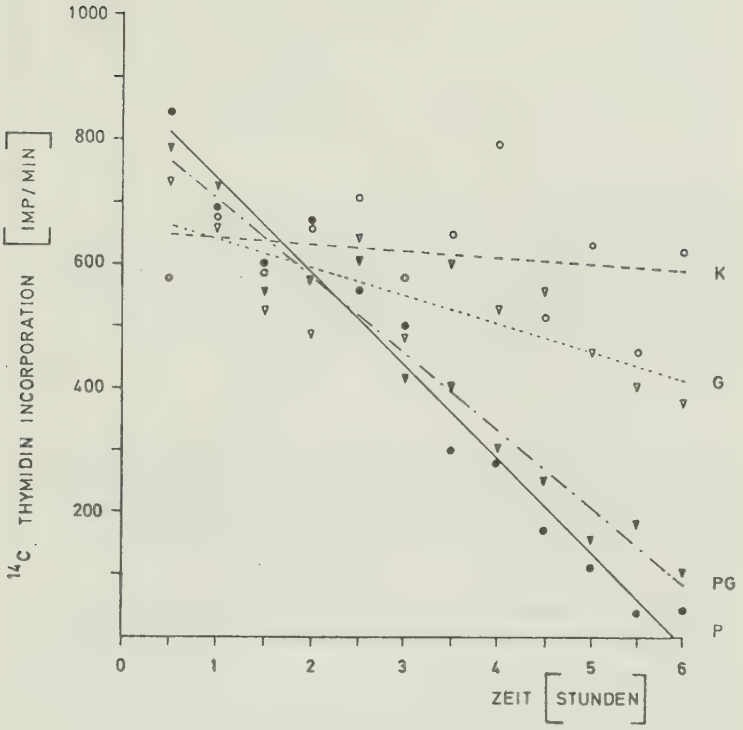

Abb. 6: Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in die TCA-unlösliche Fraktion von HEp-2-Zellen im Verlaufe der Infektion mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney unter Einwirkung von 2,6 mM Guanidin (Reihe PG) und ohne Inhibitor (Reihe P) sowie von nichtinfizierten Kontrollkulturen nach Inkubation mit (Reihe G) und ohne (Reihe K) Guanidin-Zusatz.

um eine Schwankung im Bereich des Meßfehlers, kann mit dieser Methode nicht abschließend geklärt werden.

Um sicherzustellen, daß es sich bei dieser Virus-induzierten Abschaltung der DNA-Synthese nicht nur um ein HEp-2-Zellen-spezifisches Phänomen handelt, wurde ein gleichartiger Versuch mit einer anderen Zell-Linie durchgeführt.

Fl-Zellen wurden mit Poliovirus Typ I (650 pfu/Zelle) infiziert. Die Inhibitor-Konzentration betrug 2,6 mM Guanidin (Reihe PG). Es wurde 30 Minuten mit je 1,0 µCi ^{14}C-Thymidin/Schale gepulst. Nach dem Pulsintervall wurden die Zellen erst in 10%igem Formol-Alkohol fixiert und dann das Säure-lösliche Thymidin eluiert. Als Kontrollen dienten nicht-Guanidin-behandelte, infizierte Kulturen (Reihe P).

Auch eine humane, nicht aus einem Carcinom hervorgegangene Zell-Linie, die Fl-Zellen, zeigt die Hemmung der zellulären DNA-Synthese nach einer Poliovirus-Infektion (Abb. 7). Dieses zelluläre Phänomen ist sowohl nach Inhibition der Poliovirus-Reproduktion durch 2,6 mM Guanidin, als auch ohne diesen Inhibitor nachweisbar. Dieser Versuch weist darauf hin, daß die Hemmung der DNA-Synthese ein generelles Phänomen der Poliovirus-Infektion ist.

Über einen längeren Zeitraum kann die Poliovirus-induzierte DNA-Synthesehemmung nur dann beobachtet werden, wenn die infizierten Zellen mit einem Inhibitor der Virusreplikation - wie hier z.B. mit Guanidin - behandelt werden und so der CPE hinausgezögert wird.

Die DNA-Synthese im spaeteren Infektionsablauf wurde im folgenden Versuch unter ähnlichen Bedingungen wie in dem vorangegangenem untersucht: Fl-Stammzellen, Infektionsmultiplizität 100 pfu/Zelle, 2,6 mM Guanidin, 1,0 µCi ^{14}C-Thymidin pro Schale.

Bis zur 12. Stunde nach Infektionsbeginn kann - wie Abb. 8 zeigt - die Poliovirus-induzierte DNA-Synthese-

Abb. 7: Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in die TCA-unlösliche Fraktion von Fl-Zellen im Verlaufe einer Poliovirus-Infektion unter 2,6 mM Guanidin (Reihe PG) und während einer ungehemmt ablaufenden Infektion (Reihe P).

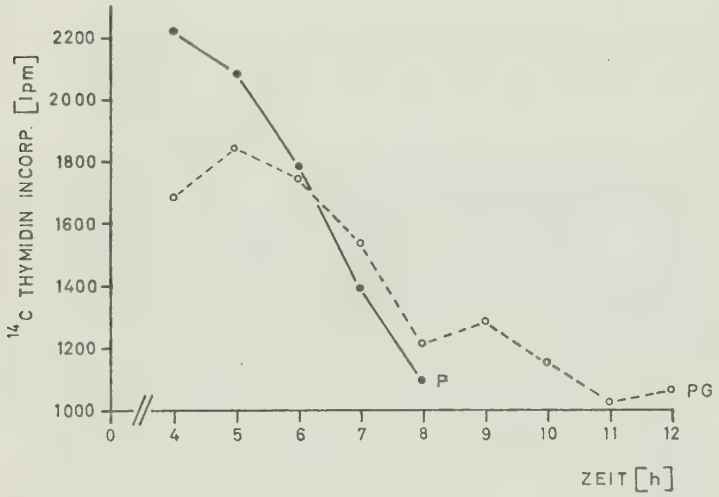

Abb. 8: Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in die TCA-unlösliche Fraktion von Fl-Zellen während der späten Stadien der Infektion mit Poliovirus unter Einwirkung von 2,6 mM Guanidin (Reihe PG) und im ungehemmten Infektionszyklus (Reihe P).

Abschaltung unter Guanidin beobachtet werden (Reihe PG). Dagegen kann in nicht mit dem Inhibitor behandelten Zellkulturen (Reihe P) die DNA-Synthese nur bis zur 8. Stunde p.i. beobachtet werden, da sich anschließend ein CPE ausbildet und die Zellen absterben.

Bei der Untersuchung der "Hemmung der DNA-Synthese nach Poliovirus-Infektion unter Guanidin" (Abb. 6) fiel auf, daß allein die Guanidin-Behandlung nicht-infizierter Zellen schon zu einer Depression der zellulären DNA-Synthese führte. Um den Zusammenhang zwischen der durch Guanidin bewirkten und der Poliovirus-induzierten DNA-Synthesehemmung zu untersuchen, wurde die DNA-Syntheserate bei unterschiedlichen Guanidin-Konzentrationen in infizierten und nicht-infizierten HEp-2-Zellen untersucht.

1.2.4. Hemmung der DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Guanidin-Konzentration

HEp-2-Zellen wurden auf Deckgläschen in Petrischalen in MEM mit 10% Kälberserum angezüchtet. Eine Reihe wurde mit Poliovirus (Multiplizität: 1000 pfu/Zelle) infiziert. Diese infizierte und eine nicht-infizierte Kontrollreihe erhielten Guanidin-Konzentrationen von 0 bis 6,3 mM. Nach 30 Minuten Adsorption wurden die Zellen einmal mit 3 ml und einmal mit 2 ml Medium der jeweiligen Guanidin-Konzentration gewaschen und das entsprechende Nährmedium zugegeben. 4 1/4 Stunden nach Inokulationsbeginn wurden die Kulturen mit 0,77 µCi ^{14}C-Thymidin in 2 ml der jeweiligen Guanidin-Konzentration 40 Minuten gepulst. Abschließend erfolgte die Elution der Säure-löslichen Zellbestandteile in 5%iger kalter TCA über 30 Minuten, Waschen in kalter TCA, Fixation mit 10%igem Formol-Alkohol und Messung der Radioaktivität.

In der Abb. 9 ist das Ausmaß der ^{14}C-Thymidin-Inkorporation in die Säure-unlösliche Fraktion von infizierten (Reihe PG) und nicht-infizierten (Reihe G) HEp-2-Zellkulturen zur 5. Stunde nach Inokulationsbeginn in Abhängigkeit von der Guanidin-Konzentration dargestellt.

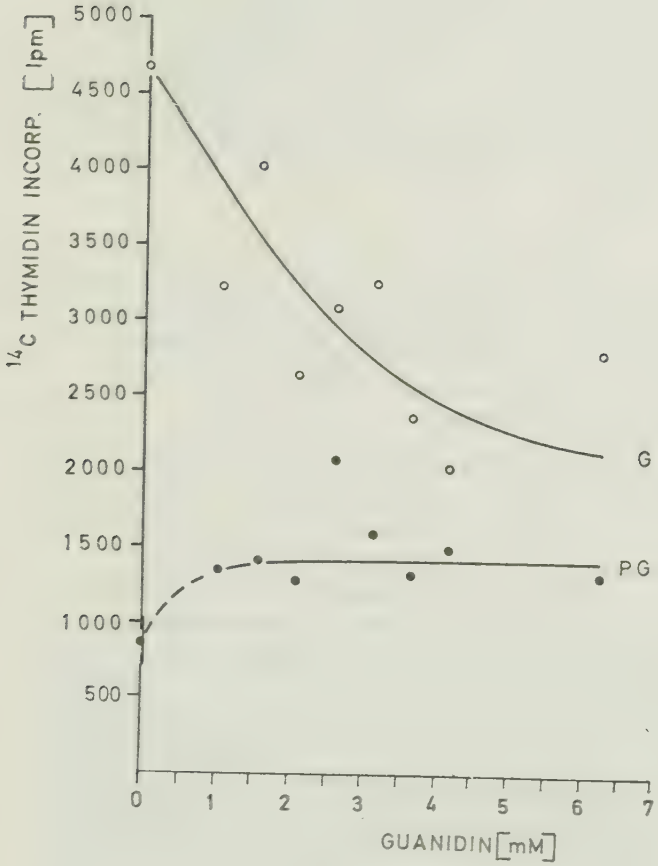

Abb. 9: Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in Säure-unlösliche Form nach fünfstündiger Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Guanidin auf nicht-infizierte (Reihe G) und Poliovirus-infizierte (Reihe PG) HEp-2-Zellkulturen.

Die Virus-induzierte Abschaltung der DNA-Synthese findet bei der gewählten hohen Infektionsmultiplizität auch unter hohen Guanidin-Konzentrationen unverändert statt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche ist in den infizierten Zellen ohne Guanidin-Einwirkung (Konzentration o) die DNA-Synthese stärker als in den Guanidin-behandelten Zellen gehemmt.

In den nicht-infizierten Kulturen ist mit steigenden Guanidindosen eine zunehmende Hemmung der DNA-Synthese nachweisbar. Der um 3o % verminderte Thymidin-Einbau in uninfizierten Zellen bei einer Guanidin-Konzentration von 2,6 mM stimmt mit dem Ergebnis aus Versuch 1.2.3. (s. Abb. 6) überein.

Die Guanidin-induzierte Hemmung der DNA-Synthese ist aber selbst bei hohen Inhibitor-Konzentrationen nicht so stark wie die Virus-induzierte. Die Poliovirus-induzierte Hemmung wird durch den Guanidin-Effekt nicht verstärkt (Abb. 9). Vielmehr scheint Guanidin durch die Hemmung der Poliovirus-Replikation die Virus-induzierte DNA-Synthese-Abschaltung zeitlich hinauszuzögern (s. Abb. 8).

Die Poliovirus-Infektion permanenter Zellkulturen führt - wie die in diesem ersten Abschnitt beschriebenen Versuche zeigen - in den frühen Infektionsphasen
1. zu einer Mitosestimulation und
2. zur Abschaltung der zellulären DNA-Synthese.
Diese in verschiedenen Zellstämmen beobachteten zellulären Phänomene sind Poliovirus-induziert. Sie werden jedoch durch die in relativ frühen Phasen der Virus-Infektion wirksamen, hier untersuchten Inhibitoren der Poliovirus-Reproduktion nicht verhindert.

Aus diesen Befunden ergab sich die Frage, ob die Mitosestimulation und die DNA-Synthese-Abschaltung nur Poliovirus-spezifisch sind oder auch ein anderes Picornavirus diese Zellveränderungen bewirkt, ob diese zellulären Phänomene also möglicherweise allgemein nach Infektion mit Viren der Picornavirusgruppe auftreten. Für die vergleichenden Untersuchungen wurde in den folgenden Versuchen das nicht Menschen-pathogene Maus-Elberfeld (ME)-Virus verwendet.

2. DNA-Synthese und Mitoseablauf in Maus-Elberfeld (ME)-Virus-infizierten Zellkulturen

Um sicher zu sein, daß das ME-Virus in den hier verwendeten L-Stammzellen, einer murinen Zell-Linie vermehrt wird, wurde in einem Vorversuch der zeitliche Verlauf der Reproduktion dieses Virus in diesen Zellen untersucht.

2.1. Reproduktion von ME-Virus in L-Stammzellen

L-Stammzellen wurden in MEM mit 10% Kälberserum angezüchtet. Nach einem Tag waren sie dicht und gleichmäßig ausgewachsen. Sie wurden mit 2,0 ml ME-Virus in MEM (4×10^8 pfu/ml) inokuliert. Nach 30 Minuten Adsorption wurden die Kulturen dreimal in 3,0 ml Nährmedium gewaschen und nicht-adsorbiertes Virus mit 3,0 ml Nährmedium mit 10% Kälberserum 30 Minuten lang eluiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit 3,0 ml MEM gewaschen und 3,0 ml MEM mit 10% Kälberserum als Nährmedium aufgegeben. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektionsbeginn wurden die Zellen von den Petrischalen mit einem Gummispatel abgekratzt und zusammen mit dem überstehenden Medium eingefroren. Die Zellen wurden nach Auftauen zusammen mit dem Überstand mit Glasperlen geschüttelt und so auch das zellgebundene Virus freigesetzt. Die Titration des Virus erfolgte ebenfalls auf L-Stammzellen.

Der zeitliche Verlauf der ME-Virus-Reproduktion in L-Stammzellen ist in der Abb. 10 dargestellt. Nach einer Latenzperiode von vier Stunden kommt es zu einem logarithmischen Anstieg der Reproduktionskurve.

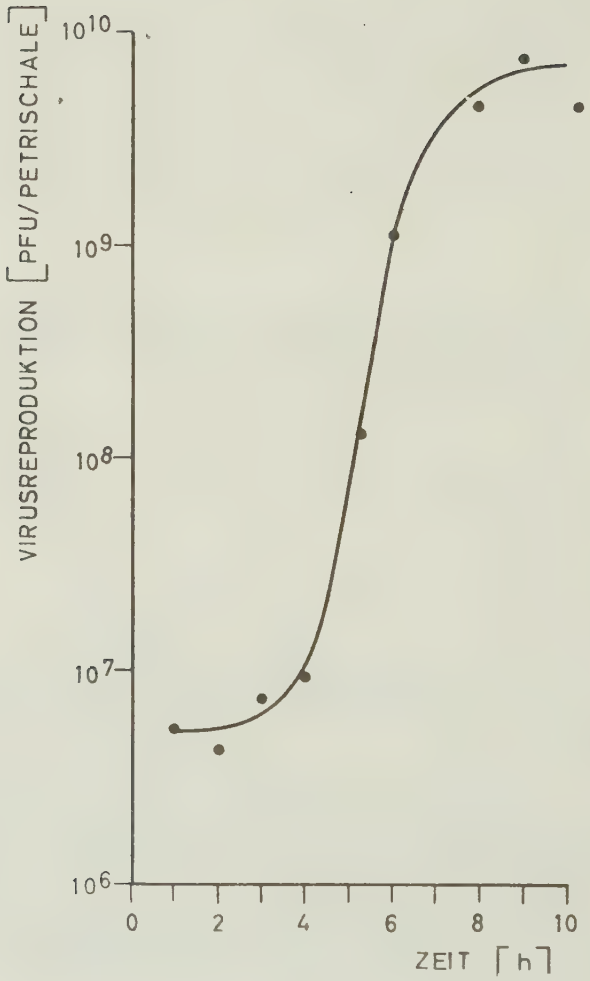

Abb.1o: Reproduktion von ME-Virus in L-Stammzellkulturen. Zellgebundene und in den Überstand freigesetzte Viruspartikel (pfu/Petrischale)

Neun Stunden nach Infektionsbeginn ist das Maximum der Reproduktion erreicht. Kurvenverlauf und Reproduktionsdauer weisen auf eine Einstufenwachstumskurve hin. Dieser Vorversuch zeigt, daß das ME-Virus in L-Stammzellen gut reproduziert wird. Dieses Wirt-Virus-System ist deshalb für die folgende Untersuchung der zellulären DNA-Synthese während der ME-Virus-Infektion geeignet.

2.2. Hemmung der DNA-Synthese in L-Stammzellen nach Infektion mit ME-Virus

Die Abschaltung der DNA-Synthese einer humanen Zell-Linie während der Poliovirus-Infektion wurde im Abschnitt 1.2. beschrieben. Um festzustellen, ob es sich bei diesem Effekt einer Virusinfektion um ein generelles Picornavirus-Phänomen handelt, sollte die DNA-Synthese von murinen L-Stammzellen während der Infektion mit dem Mäuse-pathogenen ME-Virus untersucht werden. Methodisch wurde in ähnlicher Weise wie im Abschnitt 1.2. vorgegangen. Da Guanidin die ME-Virus-Reproduktion nicht hemmt (29), wurde jedoch kein Inhibitor verwendet.

L-Stammzellen wurden in Petrischalen mit eingelegtem Deckgläschen in Hanks' Medium mit Zusatz von Lactalbuminhydrolysat, Hefeextrakt und 10% Kälberserum angezüchtet. Nach zwei Tagen waren die Kulturen gleichmäßig ausgewachsen. Zur Inokulation wurde jede Schale mit 2,0 ml ME-Virus (2×10^6 pfu/ml) 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und durch 5,0 ml Nährmedium ersetzt. Nicht-infizierte Kontrollkulturen wurden in gleicher Weise behandelt. Vor den Untersuchungsterminen wurden die Zellen mit je 1 µCi ^{14}C-Thymidin/Schale in 2,0 ml MEM 30 Minuten lang gepulst. Am Ende des Puls-Intervalles wurde Säure-lösliches Thymidin 40 Minuten lang in kalter 5%iger TCA eluiert, die Deckgläschen kurz mit kalter TCA nachgespült und ohne Fixation auf Aluminiumschälchen geklebt und getrocknet.

Die ^{14}C-Thymidin-Inkorporation in die Säure-unlösliche Fraktion ME-Virus-infizierter Zellen ist in Abb. 11 dargestellt. Zwei Stunden p.i. beginnt der

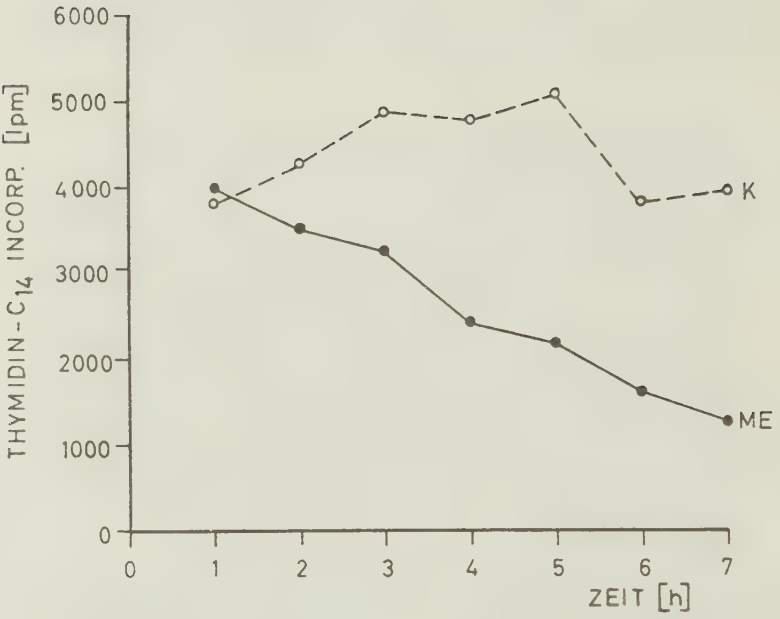

Abb. 11: Inkorporation von ^{14}C-Thymidin in die Säure-unlösliche Fraktion von L-Stammzellen im Verlaufe der Infektion mit ME-Virus (ME) und von Kontrollzellen (K).

Abfall der DNA-Synthese. Im weiteren Infektionsablauf wird kontinuierlich weniger ^{14}C-Thymidin in die DNA inkorporiert. Sieben Stunden nach Infektionsbeginn werden nur noch 3o% des Ausgangswertes eingebaut. Ein CPE tritt erst später auf.

Die Virus-induzierte Abschaltung der DNA-Synthese besteht auch in diesem Wirt-Virus-System. Der prozentuale Abfall der ^{14}C-Thymidin-Inkorporation stimmt mit den Ergebnissen der im Abschnitt 1.2. beschriebenen Versuche überein. Dies weist darauf hin, daß die Hemmung der zellulären DNA-Synthese ein allgemeines Phänomen der Picornavirus-Infektion ist.

Nachdem das Phänomen der Virus-induzierten DNA-Synthese-Abschaltung in ME-Virus-infizierten murinen L-Stammzellen bestätigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob die ME-Virus-Infektion auch zu einer Mitosestimulation der Zellen führt. In ME-Virus-infizierten L-Stammzellen kommt es jedoch zu einer Hemmung der Zellteilungsrate (59). Es besteht die Möglichkeit, daß die Picornavirus-induzierte Mitosestimulation nur in humanen Zell-Linien auftritt.

Da die Reproduktion des ME-Virus in HEp-2-Zellen in gleicher Weise wie in L-Stammzellen verläuft (57), wurde die Mitoserate in ME-Virus-infizierten HEp-2-Zellen untersucht.

2.3. Mitosestimulation von HEp-2-Kulturen nach ME-Virus-Infektion

HEp-2-Zellen wurden in MEM mit 5% Kälberserum auf Deckgläschen angezüchtet. Einen Tag später waren die Kulturen ausgewachsen und wurden mit 2,o ml ME-Virus-Inokulum je Schale (Infektionsmultiplizität 5o pfu/ml) inokuliert. Nach einer Adsorptionszeit von 3o Minuten wurde das Inokulum durch 5 ml konditioniertes Nährmedium ersetzt. Nicht-infizierte Kontrollkulturen wurden in gleicher Weise behandelt. Die Kulturen wurden nach ein bis fünf Stunden geerntet und histologisch aufgearbeitet.

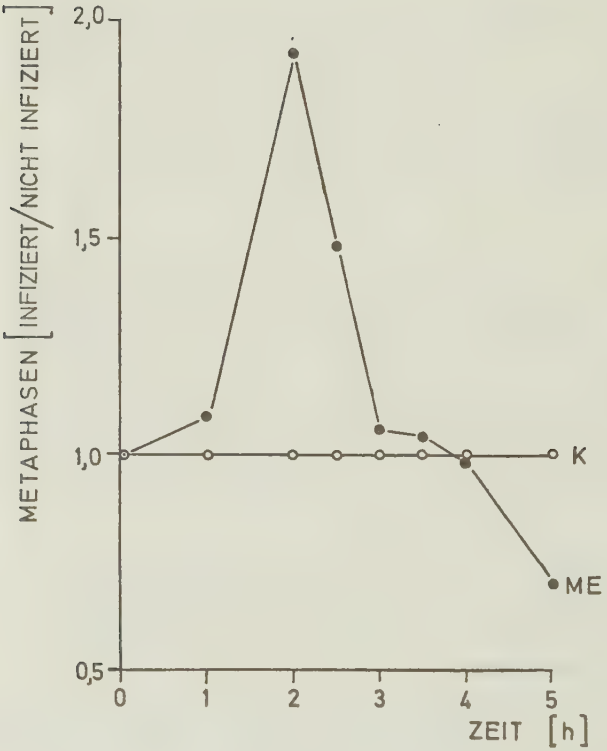

Abb. 12: Metaphase-Index in HEp-2-Zellkulturen nach Infektion mit ME-Virus (ME) im Verhältnis zu nicht-infizierten Kontrollkulturen (K).

Der Metaphase-Index in Abhängigkeit von der Infektionsdauer ist in Abb. 12 dargestellt. Es zeigt sich, daß nach der ersten Stunde p.i. ein ME-Virus-induzierter Anstieg der Zellteilung um nahezu 100% eintritt. Drei Stunden nach Infektionsbeginn ist der Metaphase-Index jedoch bereits wieder auf Werte abgefallen, die denen der nicht-infizierten Kulturen entsprechen. Zur fünften Stunde p.i. liegt er deutlich unter diesen Werten; ein CPE tritt erst acht Stunden nach Infektionsbeginn auf. Außer den Metaphasen wurden sämtliche anderen Mitosestadien mit ausgezählt. Sie zeigen ein gleichartiges Verhalten.

Vergleicht man die Mitosestimulation ME-Virus-infizierter HEp-2-Zellkulturen mit der Stimulation in Poliovirus-infizierten KB-Zellen, so fällt auf, daß die ME-Virus-induzierte Stimulation in HEp-2-Zellen früher einsetzt und schon nach drei Stunden beendet ist. Jedoch stimmt die Steiegrung des Metaphase-Index um jeweils 100% in beiden Virus-Zell-Systemen überein.

Dieser abschließende Versuch zeigt, daß verschiedene Picornaviren einen Anstieg des Metaphase-Index in infizierten Zellkulturen induzieren können. Jedoch konnte dieses Phänomen nur bei humanen Zell-Linien nachgewiesen werden.

IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden verschiedene während einer Picornavirus-Infektion auftretende zelluläre Phänomene untersucht. Hierbei handelt es sich um morphologische Veränderungen, die den Mitoseablauf in den infizierten Zellen und das Auftreten eines cytopathischen Effektes (CPE) betreffen, und um eine Störung des zellulären Stoffwechsels, die die DNA-Synthese betrifft. Um den Verlauf dieser Virus-induzierten Zellveränderungen besser definieren zu können, wurde mit zwei Inhibitoren der Virus-Vermehrung gearbeitet.

Virusinfektionen führen häufig zu Veränderungen der Zellteilungsraten.

Bei der Infektion mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney kommt es bei einer Infektionsmultiplizität von 100 pfu/Zelle zu einer Stimulation der Zellteilungsrate (Versuch 1.1.1.,Abb. 1). In KB-Zellkulturen ist der Metaphase-Index drei bis vier Stunden p.i. um etwa 100% gesteigert. Bei einer niedrigeren Infektionsmultiplizität ist diese Mitosestimulation deutlich geringer. Die Mitosestimulation durch die Infektion mit Poliovirus in dieser humanen Zell-Linie hängt somit von der Infektionsmultiplizität ab.

Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen die bereits früher beschriebene Zunahme der Zellteilungsrate während einer Infektion mit Polio- oder Rhinovirus (58, 59). Bei den meisten Virusinfektionen kommt es jedoch zu einer Verminderung der Zellteilungsrate, z.B. bei Infektion mit VSV, Vaccinia-Virus (59), Herpes simplex Virus (106, 107, 116), verschiedenen Influenza-Viren und dem Newcastle disease Virus (87, 91, 115).

Die Infektion mit Polyoma-Virus dagegen führt unter cytociden Bedingungen in nicht-transformierten Zellen zu keiner Veränderung der Zellteilungsrate (59).

Bei anderen Viren (Ektromelie und Parainfluenza III) geht

der Hemmung der Zellteilung eine anfängliche Steigerung voraus (59).

Um zu sehen, ob der Poliovirus-induzierte Effekt schon durch frühe oder erst durch späte Stadien der Virus-Reproduktion ausgelöst wird, war es erforderlich, das Phänomen der Mitosestimulation mit Inhibitoren der Virusvermehrung zu untersuchen. Verwendet wurden die Substanzen 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB) und Guanidin.

Die Behandlung nicht-infizierter Kontrollkulturen mit HBB führt zu keiner signifikanten Änderung der Metaphaserate (Versuch 1.1.3., Abb. 3 u. 4 und Tab. 2). Nach der Literatur waren bei der hier verwendeten Konzentration (178 µM) auch keine toxischen Effekte auf den Zellstoffwechsel zu erwarten (2, 36, 108).

Die Reproduktion von Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney wird durch 250 µM HBB um fast zwei Zehnerpotenzen vermindert (Versuch 1.1.2., Abb. 2). Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein (108).

Die Hemmung der Virus-Reproduktion durch HBB ist für das LCM-Virus (50, 95) und für verschiedene Enteroviren - so für Polioviren - beschrieben worden (35, 36, 41, 55, 75). HBB verzögert den Virus-induzierten CPE (36, 108), verhindert ihn jedoch nicht endgültig (7, 54). Die Substanz wirkt nur, wenn sie vor Beginn der viralen RNA-Synthese anwesend ist (15, 37, 39, 41, 109, 161). Anscheinend hemmt HBB die Virus-induzierte RNA-Polymerase (10, 38). Ein direkter Einfluß auf das infizierende Virus (108), auf die Adsorption, die Penetration (43) oder das Uncoating (37) wurde nicht beobachtet.

Werden Poliovirus-infizierte Zellen mit HBB behandelt, so zeigen sie die gleiche signifikante Metaphase-Stimulation wie unbehandelte, infizierte Kulturen (Versuch 1.1.3., Abb. 3).

Die Hemmung der Aktivität der Virus-spezifischen RNA-Polymerase durch HBB verhindert somit nicht den Anstieg des Metaphase-Index.

Die Poliovirus-induzierte Mitosestimulierung wird bereits durch frühe Stadien des Reproduktionszyklus ausgelöst, unabhängig von neusynthetisierter Virus-RNA.

Der Zyklus einer Gewebekulturzelle ist in verschiedene Stadien eingeteilt. Die weitaus längste Zeit befindet sich die Zelle in der Interphase, die cytologisch als Ruhephase erscheint. In dieser Phase werden jedoch die Vorbereitungen zur Zellteilung getroffen. Während eines sich über mehrere Stunden erstreckenden Zeitraumes wird die DNA verdoppelt (S-Phase). Dieser S-Phase geht ein Stadium fehlender DNA-Synthese voran (G_1-Phase). Auch nach Abschluß der DNA-Verdoppelung wird mehrere Stunden keine neue DNA gebildet (G_2-Phase). Der Zellzyklus endet mit der Mitose (M-Phase), in der sich die Zelle unter Bildung von zwei neuen Zellen teilt. Während die Dauer der einzelnen Stadien der Interphase sich in verschiedenen Zellstämmen unterschiedlich über mehrere Stunden erstreckt, beträgt die Mitosedauer für die meisten Zellstämme etwa eine Stunde.

Der Metaphase-Index gibt die relative Zahl aller Zellen einer Kultur an, die sich gerade in der Metaphase der Zellteilung befinden. Er gibt keinen direkten Hinweis auf die Mitosedauer oder die Zahl der wirklich in einer Zellkultur über einen längeren Zeitraum stattfindenden Mitosen.

Zerstört man den Spindelapparat sich teilender Zellen durch Colcemid, einem Colchizin-Derivat, so kann die Zellteilung nicht bis zum Ende ablaufen, und alle sich teilenden Zellen bleiben in der Metaphase arretiert. Hierdurch kann die Summe aller in einer Gewebekultur über einen bestimmten Zeitraum auftretenden Mitosen erfaßt werden.

Die Behandlung Poliovirus-infizierter Zellkulturen mit Colcemid (Versuch 1.1.3.2., Tab. 2) zeigt, daß die Poliovirus-

Infektion die absolute Zahl der Mitosen signifikant steigert, und daß deshalb die Metaphase-Stimulation in Poliovirus-infizierten Zellen nicht durch eine Verlängerung der einzelnen Mitose vorgetäuscht wird. Die zusätzliche Behandlung mit HBB hat sowohl bei nicht-infizierten, als auch bei infizierten Gewebekulturzellen keinen signifikanten Einfluß auf die jeweilige Metaphaserate.

Nach Habermehl (59) sind die Metaphasen zur 3. Stunde der Poliovirus-Infektion maximal stimuliert. Danach fällt der Metaphase-Index wieder ab und kann das Ausmaß nicht-infizierter Kontrollkulturen erreichen. Wird, wie in Versuch 1.1.3.3., die Metaphaserate Poliovirus-infizierter Zellen unter HBB über größere Zeiträume hinweg beobachtet, so zeigt sich, daß schon sieben Stunden p.i. die Zahl der augenblicklich vorhandenen Metaphasen (in nicht-Colcemid-behandelten Kulturen), als auch die Summe aller unter Colcemid-Behandlung aufgelaufenen Metaphasen in infizierten, wie nicht-infizierten Zellkulturen gleich ist (Abb. 4).

Dies bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt der Infektion keine neuen Zellen mehr aus derInterphase in die Mitose eintreten. Die Poliovirus-induzierte Stimulierung der Mitose ist zu diesem Zeitpunkt beendet.

HBB zögert in den späteren Stadien der Poliovirus-Infektion die Ausbildung eines CPE hinaus, was mit den Beobachtungen anderer Autoren übereinstimmt (7, 54, 108). Vierzehn Stunden p.i. ist aber auch in HBB-behandelten Zellkulturen ein CPE deutlich sichtbar (Abb. 4).

Da HBB weiterhin die Replikation des Poliovirus Typ I nur um zwei Zehnerpotenzen vermindert, ist diese Substanz als ein schwacher Inhibitor der Replikation dieses Virus anzusehen.

Der Inhibitor Guanidin dagegen, der - abgesehen von der >N-C=N--Gruppe (112)- keine strukturelle Verwandtschaft zum

HBB zeigt, kann mit einer Verminderung der Poliovirus-Infektion um 5 (s. Versuch 1.2.1.) bzw. 6 (27) Zehnerpotenzen als ein wesentlich stärkerer Inhibitor der Replikation des Poliovirus Typ I angesehen werden.

Guanidin wirkt außer auf verschiedene MKS-Virus-Stämme (14, 97) und das Semliki-Forest-Virus (49) auf verschiedene Enteroviren - darunter auch alle drei Poliovirus-Typen (98, 11o, 112).

Die Reproduktion der Viren wird vermindert (26, 81, 98, 11o). Die durch sie induzierte Abschaltung der RNA- und Proteinsynthese (4, 3o, 74) und der morphologisch erfaßbare Zellschaden (CPE) werden hinausgezögert (5, 71, 81, 112). Es bilden sich schnell Guanidin-resistente Mutanten aus (8o, 9o). Ein direkter Einfluß auf das infizierende Virus (81) und seine RNA (112), sowie auf die Adsorption (22, 26) und Penetration des Virus (42) wurde nicht beobachtet. Die Virus-Reproduktion in infizierten Zellen wird erst eine Stunde p.i. Guanidin-sensitiv (72).

Ebenso wie HBB führt Guanidin zu einer Hemmung der Virus-induzierten RNA-Polymerase (1o, 38) mit nachfolgender Hemmung der viralen RNA-Synthese (15, 17, 26, 18, 71) und einer verminderten Synthese viraler Proteine (16, 61).

Über den Wirkungsmechanismus des Guanidin existieren verschiedene Theorien. Einerseits wird eine Wirkung des Guanidins auf die entstehende virale RNA-Polymerase diskutiert (82, 83, 84, 85), andererseits wird eine durch Guanidin hervorgerufene veränderte "Gen-Funktion" (85) und dadurch die Produktion eines veränderten Capsid-Proteins, welches für die weitere virale RNA-Synthese notwendig ist, in den Vordergrund gestellt (23, 24, 25). Außerdem wird eine direkte Wirkung auf die glatten Membranen (94) bzw. auf die an diesen Membranen stattfindende RNA-Synthese diskutiert (16, 17, 2o). Von anderen Autoren wird die Guanidin-Wirkung dadurch erklärt, daß die neu synthetisierte Virus-

RNA sich vom sog. replication-complex nicht ablösen kann (8, 77).

Auch unter Guanidin ist die Poliovirus-induzierte Mitosestimulation in den frühen Infektionsstadien beschrieben worden (56). Eine länger dauernde Guanidin-Behandlung infizierter Zellen führt zu einem Colchizin-ähnlichen Effekt, bei dem die Mitosen in der Metaphase arretiert werden (27), und zu Veränderungen der Chromosomen und der Metaphasefigur (12, 6o), die jedoch den chromosomalen Veränderungen infizierter, nicht-Guanidin-behandelter Zellen beim CPE nicht entsprechen (13).

Da beide Inhibitoren die Poliovirus-induzierte Mitosestimulation nicht verhindern, kann dieses zelluläre Phänomen auf einen Virus-bedingten Prozess zurückgeführt werden, der - unabhängig von der Wirkung dieser Substanzen auf das Auftreten einer viralen RNA-Polymerase-Aktivität - zeitlich vor dem Einsetzen der Inhibitorfunktion abläuft. Die Mitosestimulation wird demzufolge durch frühe Stadien der Poliovirus-Infektion ausgelöst.

Voraussetzung für den normalen Ablauf einer Mitose ist die Verdoppelung des DNA-Gehaltes der Zelle vor der Zellteilung. Jede Störung der DNA-Synthese unterbricht den Ablauf der Prozesse, die mit der Auslösung der Zellteilung enden und beeinflußt somit auch die folgende Mitose.

Daraus ergab sich die Frage, ob der Poliovirus-induzierten Mitosestimulation auch eine Stimulation der DNA-Synthese vorausgeht.

Die zelluläre DNA-Synthese hat, wie Inhibitor-Untersuchungen klärten (1o4), auf die Poliovirus-Vermehrung keinen Einfluß. Die DNA selbst bleibt im Laufe der Poliovirus-Infektion unverändert (7o, 73, 1o5).

Als Maß der DNA-Synthese diente in den hier vorgelegten Untersuchungen die ^{14}C-Thymidin-Inkorporation. Die Spezifität des Einbaus wurde in Versuch 1.2.2. (Tab. 3) durch die

Anwendung verschiedener Nucleasen nachgewiesen. Es zeigte sich, daß die DNA-Synthese Poliovirus-infizierter Zellen (Versuche 1.2.3.) bis zur 6. bis 8. Stunde p.i. signifikant abfällt (Abb. 6 - 8). Die Hemmung der DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellen wird von den meisten Autoren bestätigt (2, 53, 7o, 73, 79, 86, lol). Nach Ackermann (1) kommt es zu einer direkten Hemmung der DNA-Syntheserate in der S-Phase; der Eintritt in die S-Phase wird nicht verhindert. Die gleichen Autoren stellten in Poliovirus-infizierten Guanidin-behandelten Zellen die Abhängigkeit der DNA-Synthese von der Infektionsmultiplizität und dem Aminosäuregehalt des Mediums fest (2, 3).

Die Guanidin-Behandlung nicht-infizierter Kontrollkulturen bewirkt eine leichte Verminderung der DNA-Syntheserate, die konzentrationsabhängig ist (Versuch 1.2.4., Abb. 9).

Während bei geringen Guanidin-Konzentrationen (o,65 mM) keine Hemmung der DNA-Synthese in uninfizierten Zellen beobachtet werden konnte (2) und bei höheren Konzentrationen (1,6 und lo mM) eine unveränderte Morphologie (26) und Wachstumsrate (81) beobachtet wurden, führen extreme Konzentrationen (s. Abb. 9) zu einem Abfall der DNA-Synthese, zu einer späteren Mitosehemmung (27, 6o).und innerhalb weniger Tage zu einem kompletten CPE (26).

Die DNA-Synthese-Abschaltung in Poliovirus-infizierten Zellen ist wesentlich stärker als die Guanidin-induzierte in nicht-infizierten Zellen (Abb. 9). Auch unter Guanidin ist, selbst bei einer maximalen Konzentration, die DNA-Synthese in Poliovirus-infizierten Zellen niedriger als in den entsprechenden nicht-infizierten Zellen. Die Poliovirus-induzierte Abschaltung der DNA-Synthese ist durch die Behandlung mit dem Inhibitor Guanidin nicht beeinflußbar (Versuch 1.2.3., Abb. 6 - 8).

Aus der Untersuchung der Mitoserate und der DNA-Synthese in verschiedenen Poliovirus-infizierten humanen Zell-Linien

ist zu erkennen, daß der Poliovirus-induzierten Mitosestimulation in diesen Zellen keine gesteigerte DNA-Synthese vorausgeht, sondern daß die DNA-Synthese nach der Poliovirus-Infektion erheblich gehemmt wird.

Die Mitosestimulation in Poliovirus-infizierten Zellen ist also nicht Ausdruck eines physiologischen Zellzyklus, sondern muß als ein spezifisches pathologisches Substrat der Poliovirus-Infektion betrachtet werden.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob diese beiden Poliovirus-induzierten zellulären Phänomene Virus- oder Zellabhängig sind, ob sie also auch durch andere Picornaviren und in nicht-humanen Zell-Linien induzierbar sind.

Die vergleichenden Untersuchungen wurden mit dem Maus-Elberfeld (ME)-Virus durchgeführt. Aufgrund seines serologischen Verhaltens gehört dieses Virus ebenso wie das EMC- und das Mengo-Virus zur Columbia SK-Gruppe, einer Gruppe innerhalb der Picornaviren (47, 65). Es ist nicht menschenpathogen, ähnelt aber dem Poliovirus bezüglich des RNA- und Proteingehaltes, der Struktur der Hüllprotein-Untereinheiten (loo) sowie physikalischen Eigenschaften (UV-Absorptionsspektrum, Buoyantdichte und Sedimentationskoeffizient der RNA) und der elektronenmikroskopischen Morphologie (99).

Das ME-Virus wird u.a. in L-Stammzellen vermehrt (48, 63, 69). Zwei Stunden nach Infektionsbeginn wird infektiöse RNA und ein Komplement-bindendes Protein gebildet (64). Drei Stunden p.i. ist eine Hämadsorption nachweisbar (66). Zur gleichen Zeit beginnt die Bildung (64) und zur fünften Stunde die Freisetzung (69) infektiöser Partikel.

Übereinstimmend damit setzt in L-Stammzellen, wie in HEp-2-Zellen (57), vier Stunden nach der ME-Virus-Infektion die Virus-Reproduktion ein (Versuch 2.1., Abb. lo) und erreicht zur neunten Stunde nach Infektionsbeginn ihr Maximum.

Das ME-Virus führt ebenso wie das Mengo-Virus (48, 89) zur

Abschaltung der zellulären RNA- (48, 63, 76) und Protein- (51, 67, 68, 1o3)- Synthese. Für diese Abschaltung wird die Bildung von "early proteins" verantwortlich gemacht (114).

Durch die ME-Virus-Infektion wird, ebenso wie durch die Infektion mit Mengo-Virus (44, 48), die zelluläre DNA-Synthese gehemmt. Autoradiographisch wurde nachgewiesen (1o3), daß die Anzahl der DNA-synthetisierenden Zellen nach sechs Stunden auf 2o% abfällt. Das eigene Ergebnis bestätigt diesen Befund (Versuch 2.2., Abb. 11). Die DNA-Synthese in L-Stammzellen wird im Laufe der ME-Virus-Infektion deutlich gehemmt und erreicht zur siebten Stunde p.i. etwa 3o % des Ausgangswertes.

Dieses Ergebnis zeigt, daß auch die Infektion einer nicht-humanen Zell-Linie mit einem anderen Picorna-Virus zu einer Abschaltung der zellulären DNA-Synthese führt. Bei der Virus-induzierten Hemmung der zellulären DNA-Synthese handelt es sich um ein allgemeines Phänomen der Virus-Infektion.

Im Gegensatz zu der Mitosestimulation in humanen Zell-Linien nach der Poliovirus-Infektion wurde bei der ME-Virus-Infektion in L-Stammzellen eine deutliche Hemmung der Mitose-Aktivität nach der dritten Stunde p.i. beschrieben (59). Die Infektion der humanen HEp-2-Zellen (Versuch 2.3., Abb. 12) zeigt dagegen eine Stimulation des Metaphase-Index um annähernd loo %, die bereits zur zweiten Stunde p.i. das Maximum aufweist. Drei Stunden p.i. ist in den infizierten Kulturen die Zellteilungsrate wieder normalisiert, und erst zur fünften Stunde p.i. fällt der Metaphase-Index gegenüber dem in nicht-infizierten Kontrollkulturen ab.
Ein CPE ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht sichtbar.

Die unterschiedliche Mitose-Aktivität verschiedener Zellstämme nach Infektion mit ME-Virus scheint in erster Linie zellspezifisch zu sein. Während die Poliovirus-induzierte Mitosestimulation in menschlichen Gewebekulturen nachweisbar war, zeigten nach der ME-Virus-Infektion die murinen Fibroblasten

eine Hemmung, dagegen menschliche Zellen eine Stimulation der Zellteilungsrate.

Die Ursachen der Virus-induzierten Veränderungen der Mitose-Aktivität infizierter Zellen sind noch nicht hinreichend geklärt. Für eine Hemmung der Mitose-Aktivität könnte zunächst die Virus-induzierte Abschaltung der zellulären Makromolekül-Synthese verantwortlich gemacht werden. Für die späten Stadien der Infektion ist dies wahrscheinlich auch von Bedeutung.

In den frühen Stadien hingegen brauchen solche Abschaltvorgänge keineswegs eine Hemmung der Zellteilung zu bewirken, wie die angeführte Mitosestimulation nach der Poliovirus- und ME-Virus-Infektion zeigt. Es bestehen im Gegenteil Hinweise darauf, daß geringe Hemmungen der zellulären Protein-Synthese eine Mitosestimulation auslösen könnten (57). Die Poliovirus- und ME-Virus-induzierte Mitosestimulation weist darauf hin, daß man das Verhalten der Zellteilung keineswegs nur unter dem Gesichtspunkt des CPE sehen darf.

Es muß somit offen bleiben, wodurch die bereits frühzeitig einsetzende Mitosehemmung oder -stimulation in ME-Virus-infizierten Zellen ausgelöst wird.

Die Frage, ob die Stimulation durch die Unterdrückung der zellulären Protein-Synthese oder durch das Auftreten früher viraler Proteine in der Zelle ausgelöst wird, konnte nicht geklärt werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Synthese und der Mitoseablauf in verschiedenen Zell-Linien nach Picornavirus-Infektionen untersucht.
Die Inhibitoren der Poliovirus-Reproduktion 2-(α-Hydroxybenzyl)-Benzimidazol (HBB) und Guanidin verzögerten die Ausbildung eines cytopathischen Effektes der Poliovirus-infizierten Zellen, so daß der Einfluß der Infektion auf die DNA-Synthese und den Teilungsrhythmus der Zellen beobachtet werden konnte.

Die Infektion mit Poliovirus Typ I, Stamm Mahoney führt in humanen Zell-Linien zu einer Mitose-Stimulation der infizierten Zellen. Durch Arretierung der sich teilenden Zellen mit Colcemid wurde festgestellt, daß diese Mitose-Stimulation nicht durch eine verlängerte Mitosedauer vorgetäuscht wird, sondern daß sich in den ersten Stunden der Poliovirus-Infektion die Mitoserate der Zellkulturen tatsächlich verdoppelt. HBB beeinflußt die Mitoserate in Poliovirus-infizierten Zellkulturen nicht. Daraus folgt, daß die Mitose-Stimulation durch die frühen, nicht Inhibitor-beeinflußten Infektionsphasen ausgelöst wird.

Gleichzeitig wird in der Poliovirus-infizierten Zelle die DNA-Synthese abgeschaltet. Auch dieses zelluläre Phänomen ist durch einen Inhibitor der Virusreproduktion (Guanidin) nicht beeinflußbar und muß durch frühe Stadien der Virusinfektion ausgelöst werden.

Um zu untersuchen, ob die Mitose-Stimulation in infizierten Zellkulturen ein allgemeines Phänomen der Picornavirus-Infektion ist, wurde die Mitoserate unter dem Einfluß einer Maus-Elberfeld(ME)-Virus-Infektion untersucht. In diesem Virus-System wird die Mitose-Stimulation nur in humanen Zellen beobachtet. Murine Zellkulturen zeigen einen Abfall der Mitoserate. Die DNA-Synthesehemmung dagegen ist bei einer ME-Virus-Infektion auch in murinen Zellen vorhanden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die Mitose-Stimulation von der Herkunft der Zellen abhängt, während im Gegensatz dazu die Hemmung der DNA-Synthese

ein allgemeines Phänomen der Picornavirus-Infektion zu sein scheint.Dieses Ergebnis bedarf jedoch weiterer Bestätigung.

Literaturverzeichnis

1. Ackermann, W.W., C.D. Powers and D. Wahl:
Susceptibility of HeLa cells in S-phase to inhibition of DNA synthesis by poliovirus infection
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 827 - 830 (1966)

2. Ackermann, W.W., D.C. Cox, H. Kurtz, C.D. Powers and S.J. Davies:
Effect of poliovirus on deoxyribonucleic acid synthesis in HeLa cells
J. Bacteriol. 91, 1943 - 1952 (1966)

3. Ackermann, W.W., S.J. Davies and D. Wahl:
Effects of multiplicity of poliovirus infection of HeLa cells upon regulation of DNA synthesis
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 976 - 980 (1967)

4. Bablanian, R.:
Depression of macromolecular synthesis in cells infected with guanidine-dependent poliovirus under restrictive conditions
Virology 47, 255 - 259 (1972)

5. Bablanian, R., H.J. Eggers and I. Tamm:
Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage I. The relation between poliovirus induced metabolic and morphological alterations in cultured cells
Virology 26, 100 - 113 (1965)

6. Bablanian, R., H.J. Eggers and I. Tamm:
Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage II. The relation between poliovirus growth and virus induced morphological changes in cells
Virology 26, 114 - 121 (1965)

7. Bablanian, R., H.J. Eggers and I. Tamm:
Inhibition of enterovirus cytopathic effects by 2-(α-hydroxy-benzyl)-benzimidazole
J. Bacteriol. 91, 1289 - 1294 (1966)

8. Baltimore, D.:
In "Medical and applied virology"
(Sanders, M. and E.H. Lennette, Eds.)
pp. 340 - 347
Warren H. Green,Inc., St. Louis, Mo. (1968)

9. Baltimore, D. and R.M. Franklin:
The effect of mengovirus infection on the activity of the DNA-dependent RNA polymerase of L-cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1383 - 1390 (1962)

10. Baltimore, D., H.J. Eggers, R.M. Franklin and I. Tamm:
Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49, 843 - 849 (1963)

11. Baltimore, D., R.M. Franklin and J. Callender:
Mengovirus-induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis
Biochim. Biophys. Acta 76, 425 - 430 (1963)

12. Bartsch, H.D., K.-O. Habermehl and W. Diefenthal:
Chromosomal damage after infection with poliomyelitis virus
Exp. Cell Res. 48, 671 - 675 (1967)

13. Bartsch, H.D., K.-O. Habermehl and W. Diefenthal:
Correlation between poliomyelitisvirus-reproduction-cycle, chromosomal alterations and lysosomal enzymes
Arch. Ges. Virusforsch. 27, 115 - 127 (1969)

14. Black, D.N. and F. Brown:
Effect of actinomycin D and guanidine on the formation of a ribonucleic acid polymerase induced by foot-and-mouth-disease virus and on the replication of virus and viral ribonucleic acid
Biochem. J. 112, 317 - 323 (1969)

15. Caliguiri, L.A., H.J. Eggers, N. Ikegami and I. Tamm:
A single-cell study of chemical inhibition of enterovirus multiplication
Virology 27, 551 - 558 (1965)

16. Caliguiri, L.A. and I. Tamm:
Action of guanidine on the replication of poliovirus RNA
Virology 35, 408 - 417 (1968)

17. Caliguiri, L.A. and I. Tamm:
Distribution and translation of poliovirus RNA in guanidine-treated cells
Virology 36, 223 - 231 (1968)

18. Caliguiri, L.A. and I. Tamm:
Effects of guanidine on the biosynthesis of poliovirus
Ann. N.Y. Acad. Sci. 173, 420 - 426 (1970)

19. Caliguiri, L.A. and I. Tamm:
The role of cytoplasmic membranes in Poliovirus biosynthesis
Virology 42, 100 - 111 (1970)

20. Caliguiri, L.A. and I. Tamm:
Characterization of poliovirus-specific structures associated with cytoplasmic membranes
Virology 42, 112 - 122 (1970)

21. Caliguiri, L.A. and A.G. Mosser:
Proteins associated with the poliovirus RNA replication complex
Virology 46, 375 - 386 (1971)

22. Carp, R.I.:
Studies on the guanidine character of poliovirus
Virology 22, 270 - 279 (1964)

23. Cooper, P.D.:
A genetic map of poliovirus temperature-sensitive mutants
Virology 35, 584 - 596 (1968)

24. Cooper, P.D., B.B. Wentworth and D. McCahon:
Guanidine inhibition of poliovirus: A dependance of viral RNA synthesis on the configuration of structural protein
Virology 4o, 486 - 493 (197o)

25. Cooper, P.D., E. Geissler, P.D. Scotti and G.A. Tannock:
Further characterization of the genetic map of poliovirus temperature sensitive mutants
in "Strategy of the viral genome" (Wolstenholme, G.E.W. and M. O'Connor, Eds.), Ciba Foundation Symp., p. 75 - 95
Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1971)

26. Crowther, D., J.L. Melnick:
Studies of the inhibitory action of guanidine on poliovirus multiplication in cell cultures
Virology 15, 65 - 74 (1961)

27. Diefenthal, R.:
Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturzellen nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin
Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin (1968)

28. Diefenthal, W. und K.-O. Habermehl:
Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luft-Gemisches für Monolayer-Gewebekulturen in Petrischalen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 185, 11 - 13 (1962)

29. Diefenthal, W.:
Unveröffentlichte Mitteilung 1971

3o. Diefenthal, W., K.-O. Habermehl and F.P. Schelp:
Effect of metabolic inhibitors upon virus-induced inhibition of host cell macromolecular synthesis
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 218, 32 - 4o (1971)

31. Dulbecco, R. and M. Vogt:
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses
J. Exp. Med. 99, 167 - 182 (1954)

32. Eagle, H.:
Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB (21811)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 362 - 364 (1955)

33. Eagle, H.:
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures
Science 13o, 432 - 437 (1959)

34. Earle, W.R.:
Production of malignancy in vitro IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells
J. Nat. Cancer Inst. 4, 165 - 212 (1943)

35. Eggers, H.J. and I. Tamm:
2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole (HBB) as an aid in virus classification
Virology 13, 545 - 546 (1961)

36. Eggers, H.J. and I. Tamm:
Spectrum and characterization of the virus inhibitory action of 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole
J. Exp. Med. 113, 657 - 686 (1961)

37. Eggers, H.J. and I. Tamm:
On the mechanism of selective inhibition of enterovirus multiplication by 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole
Virology 18, 426 - 438 (1962)

38. Eggers, H.J., D. Baltimore and I. Tamm:
The relation of protein synthesis to formation of poliovirus RNA polymerase
Virology 21, 281 - 283 (1963)

39. Eggers H.J. and I. Tamm:
Inhibition of enterovirus RNA synthesis by 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole
Nature 197, 1327 - 1328 (1963)

4o. Eggers H.J. and I. Tamm:
Synergistic effect of 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine on picornavirus reproduction
Nature 199, 513 - 514 (1963)

41. Eggers, H.J., Reich E. and I. Tamm:
The drug-requiring phase in the growth of drug-dependent enteroviruses
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 5o, 183 - 19o (1963)

42. Eggers, H.J., N. Ikegami and I. Tamm:
Comperative studies with selective inhibitors of picornavirus reproduction
Ann. N. Y. Acad. of Sci. 13o, 267 - 281 (1965)

43. Eggers H.J. and E. Waidner:
Effect of HBB and guanidine on the uncoating of ECHO virus 12
Nature 227, 952 - 953 (197o)

44. Ensminger, W.D. and I. Tamm:
Inhibition of synchronized cellular deoxyribonucleic acid synthesis during Newcastle disease virus, mengovirus, or reovirus infection
J. Virol. 5, 672 - 676 (197o)

45. Fitzgerald, P.H. and L.A. Brehaut:
Depression of DNA synthesis and mitotic index by colchicine in cultured human lymphocytes
Exp. Cell Res. 59, 27 - 31 (1970)

46. Fogh, J. and R.O. Lund:
Continuous cultivation of epithelial cell strain (F1) from human amniotic membrane
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 532 - 537 (1957)

47. Franklin, R.M., E. Wecker and C. Henry:
Some properties of an infectious ribonucleic acid from muose encephalomyelitis virus
Virology 7, 220 - 235 (1959)

48. Franklin, R.M. and D. Baltimore:
Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 175 - 196 (1962)

49. Friedman, R.M.:
Basis for variable response of arboviruses to guanidine treatment
J. Virol. 6, 628 - 636 (1970)

50. Furusawa, E., W. Cutting and A. Furst:
Inhibitory effect of antiviral compounds on Culumbia SK, LCM, vaccinia and adenotype 12 viruses in vitro
Chemotherapia 8, 95 - 105 (1964)

51. Gauntt, C.J. and R.Z. Lockart jr.:
Destruction of L cells by mengovirus: use of interferon to study the mechanism
J. Virol. 2, 567 - 575 (1968)

52. Girard, M., D. Baltimore and J.E. Darnell:
The poliovirus replication complex: site for synthesis of poliovirus RNA
J. Mol. Biol. 24, 59 - 74 (1967)

53. Goldfine, H., R. Koppelmann and E.A. Evans jr.:
Nucleoside incorporation into HeLa cells infected with poliomyelitis virus
J. Biol. Chem. 232, 577 - 588 (1958)

54. Guskey, L.E., P.C. Smith and D.A. Wolff:
Patterns of cytopathology and lysosomal enzyme release in poliovirus-infected HEp-2 cells treated with either 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine-HCl
J. Gen. Virol. 6, 151 - 161 (1970)

55. Gwaltner, J.M. jr.:
The spectrum of rhinovirus inhibition by 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole and D-(-)-2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole HCl
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129, 665 - 673 (1968)

56. Habermehl, K.-O.:
The influence of virus infections on cell division
Abstr. IX. Internat. Congr. Microbiol., Moscow
IX, 49o (1966)

57. Habermehl, K.-O.:
Unveröffentlichte Mitteilung (1971)

58. Habermehl, K.-O. and W. Diefenthal:
The influence of virus infections on the mitotic cycle
14th Ann. Meeting, Canad. Soc. of Microbiol., Fredericton (1964)

59. Habermehl, K.-O. und W. Diefenthal:
Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung
Zbl. Bakt., Hyg., I. Abt. Orig. A 199, 273 - 314 (1966)

6o. Habermehl, K.-O., R. Diefenthal und W. Diefenthal:
Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturzellen nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin
Arch. ges. Virusforsch. 26, 138 - 148 (1969)

61. Halperen, S., H.J. Eggers and I. Tamm:
Evidence for uncoupled synthesis of viral RNA and viral capsids
Virology 24, 36 - 46 (1964)

62. Hanks, J.H. and R.E. Wallace:
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 - 2oo (1949)

63. Hausen, H.:
Cytologische Studien über die Vermehrung des ME-Virus in L-Zellen
Z. Naturf. 17b, 158 - 16o (1962)

64. Hausen, P. und W. Schäfer:
Produktion von Virus-RNS und -Antigen bei der Vermehrung des Mäuse-Encephalomyelitis-(ME)-Virus
Z. Naturf. 16b, 72 - 73 (1961)

65. Hausen, P. und W. Schäfer:
Untersuchungen über ein Mäuse-Encephalomyelitis-Virus. Reinigung und physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus
Z. Naturf. 17b, 15 - 22 (1962)

66. Hausen, P.:
Vermehrung eines Virus der Columbia SK-Gruppe (ME-Virus) in L-Zellen I. Mitt.: Auftreten virusspezifischer Produkte in infizierten Zellen und Charakterisierung des hämadsorbierenden Materials
Z. Naturf. 18b, 1o22 - 1o27 (1963)

67. Hausen, P.:
Vermehrung eines Virus der Columbia SK-Gruppe (ME-Virus) in L-Zellen II. Mitt.: Untersuchungen über die Proteinsynthese in infizierten Zellen
Z. Naturf. 18b, 1028 - 1031 (1963)

68. Hausen P. and D.W. Verwoerd:
Studies on the multiplication of a member of the Columbia SK group (ME virus) in L cells
III. Alterations of RNA and protein synthesis patterns in virus-infected cells
Virology 21, 617 - 627 (1963)

69. Henry, C. and R.M. Franklin:
Growth of mouse encephalomyelitis virus in Earle's L cells
Virology 9, 84 - 95 (1959)

70. Holland, J.J.:
Altered base ratios in RNA synthesized during enterovirus infection of human cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 2044 - 2051 (1962)

71. Holland, J.J.:
Depression of host-controlled RNA synthesis in human cells during poliovirus infection
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49, 23 - 28 (1963)

72. Holland, J.J.:
Enterovirus entrance into specific host cells and subsequent alterations of cell protein and nucleic acid synthesis
Bacteriol. Rev. 28, 3 - 13 (1964)

73. Holland, J.J. and P.A. Peterson:
Nucleic acid and protein synthesis during poliovirus infection of human cells
J. Mol. Biol. 8, 556 - 573 (1964)

74. Holland J.J.:
Inhibition of host cell macromolecular synthesis by high multiplicities of poliovirus under conditions preventing virus synthesis
J. Mol. Biol. 8, 574 - 581 (1964)

75. Hollinshead, A.C. and P.K. Smith:
Effects of certain purines and related compounds on virus propagation
J. Pharmacol. Exp. Therap. 123, 54 - 62 (1958)

76. Holoubek, V. and T.T. Crocker:
Histones and RNA metabolism in Ehrlich ascites cells infected with Maus-Elberfeld virus
Virology 43, 527 - 530 (1971)

77. Huang, A.S. and D. Baltimore:
Initiation of polyribosome formation in poliovirus-infected HeLa cells
J. Mol. Biol. 47, 275 - 291 (1970)

78. Kadin, S.B., H.J. Eggers and I. Tamm:
Synthesis and virus-inhibitory activity of D-and L-isomers of 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole
Nature 201, 639 - 640 (1964)

79. Levy, H.B.:
Intracellular sites of poliovirus reproduction
Virology 15, 173 - 184 (1961)

80. Loddo, B., W. Ferrari, A. Spanedda and G. Brotzu:
In vitro guanidine-resistance and guanidine-dependence of poliovirus
Experientia 18, 518 - 519 (1962)

81. Loddo, B., W. Ferrari, G. Brotzu and A. Spanedda:
In vitro inhibition of infectivity of polio viruses by guanidine
Nature 193, 97 - 98 (1962)

82. Lwoff, A.:
The thermosensitive critical evants of the viral cycle
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 159 - 174 (1962)

83. Lwoff, A. et M. Lwoff:
L'action de la guanidine sur le développement du poliovirus
C.R. Acad. Sci. Paris 256, 5001 - 5004 (1963)

84. Lwoff, A., A. Koch et M. Lwoff:
Effects de la guanidine et de l'urée sur diverses souches sensibles, resistantes et exigeantes du poliovirus
C.R. Acad. Sci. Paris 257, 3702 - 3704 (1963)

85. Lwoff, A.:
The specific effectors of viral development
Biochem. J. 96, 289 - 301 (1965)

86. Maassab, H.F., P.C. Loh and W. Ackermann:
Growth characteristics of poliovirus in HeLa cells nucleic acid metabolism
J. Exp. Med. 106, 641 - 648 (1957)

87. Marcus, Ph. I. and Th. I. Puck:
Host cell interaction of animal viruses I. Titration of cell killing by viruses
Virology 6, 405 - 423 (1958)

88. Martin, E.M. and T.S. Work:
Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected mammalian cells 4. The localization of metabolic changes within subcellular fractions of Krebs II mouse-ascites-tumor cells infected with encephalomyocarditis virus
Biochem. J. 81, 514 - 520 (1961)

89. Mc Cormick, W. and S. Penman:
Inhibition of macromolecular synthesis in HeLa and L cells by mengovirus
Virology 31, 135 - 141 (1967)

90. Melnick, J.L., D. Crowther and J. Barrera-Oro:
Rapid development of drug-resistant mutants of poliovirus
Science 134, 557 (1961)

91. Moore, A.E. and I.C. Diamond:
Factors influencing the effect of hemagglutinating viruses on tumor cell suspensions
J. Immunol. 71, 441 - 450 (1953)

92. Moore, A.E., L. Sabachewsky and H.W. Toolan:
Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells
Cancer Res. 15, 598 - 602 (1955)

93. Mosser, A.G., L.A. Caliguiri, A.S. Scheid and I. Tamm:
Chemical and enzymatic characteristics of cytoplasmic membranes of poliovirus-infected HeLa cells
Virology 47, 30 - 38 (1972)

94. Mosser, A.G., L.A. Caliguiri and I. Tamm:
Incorporation of lipid precursors into cytoplasmic membranes of poliovirus-infected HeLa cells
Virology 47, 39 - 47 (1972)

95. Pfau, C.J. and K.P. Camyre:
Inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus multiplication by 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole
Virology 35, 375 - 380 (1968)

96. Powers, C.D., B.A. Miller, H. Kurtz and W.W. Ackermann:
Specific effect of guanidine in the programming of poliovirus inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis
J. Virol. 3, 337 - 342 (1969)

97. Pringle, C.R.:
Inhibition of multiplication of foot-and-mouth-disease virus by guanidine hydrochlorid
Nature 204, 1012 - 1013 (1964)

98. Rightsel, W.A., J.R. Dice, R.J. McAlpine, E.A. Timm. I. W. McLean jr., G.J. Dixon and F.M. Schabel jr. :
Antiviral effect of guanidine
Science 134, 558 - 559 (1961)

99. Rueckert, R.R. and W. Schäfer:
Studies on the structure of viruses of the Columbia SK group I. Purification and properties of ME-virus grown in Ehrlich ascites cell suspensions
Virology 26, 333 - 344 (1965)

100. Rueckert, R.R., A.K. Dunker and C.M. Stoltzfus:
The structure of Mouse-Elberfeld virus: a model
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 912 - 919 (1969)

101. Salzmann, N.P., R.Z. Lockart jr. and E.D. Sebring:
Alterations in HeLa cells metabolism resulting from poliovirus infection
Virology 9, 244 - 259 (1959)

102. Sanford, K.K., W.R. Earle and G.D. Likely:
The growth in vitro of single isolated tissue cells
J. Nat. Cancer Inst. 9, 229 - 246 (1948)

103. Scholtissek, Ch., R. Rott, P. Hausen, H. Hausen and W. Schäfer:
Comparative studies of RNA and protein synthesis with a myxovirus and a small polyhedral virus
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 245 - 256 (1962)

104. Simon, E.H.:
Evidence for the nonparticipation of DNA in viral RNA synthesis
Virology 13, 105 - 118 (1961)

105. Simon, E.H.:

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 243 - 244 (1962)

106. Stoker, M.G.P. and A. Newton:
The effect of herpes virus on HeLa cells dividing parasynchronously
Virology 7, 438 - 448 (1959)

107. Stoker, M.G.P. and A. Newton:
Mitotic inhibition in HeLa cells caused by herpes virus
Ann. N. Y. Acad. Sci. 81, 129 - 132 (1959)

108. Tamm, I., R. Bablanian, M.N. Nemes, C.H. Shunk, F.M. Robinson and K. Folkers:
Relationship between structure of benzimidazole derivatives and selective virus inhibitory activity. Inhibition of poliovirus multiplication and cytopathic effects by 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole, and its 5-chloroderivative
J. Exp. Med. 113, 625 - 655 (1961)

109. Tamm, I. and H.J. Eggers:
Selective chemical inhibition of viral nucleic acid synthesis
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 196 - 198 (1962)

110. Tamm, I. and H.J. Eggers:
Differences in the selective virus inhibitory action of 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine-HCl
Virology 18, 439 - 447 (1962)

111. Tamm, I. and H.J. Eggers:
Cross-resistance of poliovirus to 2-(α-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine hydrochloride
Bact. Proc. 1962, 139 (1962)

112. Tamm, I. and H.J. Eggers:
Specific inhibition of replication of animal viruses
Science 142, 24 - 33 (1963)

113. Taylor, E.W.:
The mechanism of colchicine inhibition on mitosis I. Kinetics of inhibition and the binding of ^{3}H-colchicine
J. Cell Biol. 25, 145 - 160 (1965)

114. Verwoerd, D.W. and P. Hausen:
Studies on the multiplication of a member of the Columbia SK group (ME virus) in L cells IV. Role of "early proteins" in virus induced metabolic changes
Virology 21, 628 - 635 (1963)

115. Wheelock, E.F. and I. Tamm:
Mitosis and division in HeLa cells infected with influenza or Newcastle disease virus
Virology 8, 532 - 536 (1959)

116. Wildy, P., C. Smith, A. Newton and P. Bendy:
Quantitative cytological studies on HeLa cells infected with herpes virus
Virology 15, 486 - 500 (1961)

Herrn Prof.Dr.med. K.-O.Habermehl danke ich für die Überlassung des Themas, die vielen hilfreichen Anregungen und die Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Prof.Dr.med. W.Diefenthal für sein ständiges kritisches Interesse am Fortgang der Arbeit.Die geschickte technische Assistenz von Frau H.Voss und Frau E.John erkenne ich dankbar an.

Lebenslauf

Am 28. Dezember 1941 wurde ich, Michael Buchholz, als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Kurt Buchholz und seiner Ehefrau Anne-Marie geb. Felleckner in Berlin geboren.

In Berlin besuchte ich die Schule, legte im Februar 1960 die Reifeprüfung ab und begann zum Sommersemester 1960 an der Freien Universität das Studium der Medizin. Am 21. April 1961 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 28. März 1963 die ärztliche Vorprüfung, und am 26. Oktober 1966 legte ich die ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote "gut" ab.

Nach zweijähriger Tätigkeit als Medizinalassistent erhielt ich am 2. Dezember 1968 die Bestallung als Arzt und war zunächst auf der Inneren Abteilung des Städt. Wenckebach-Krankenhauses unter Prof. Dr. med. W.-D. Germer tätig. Seit dem 15. April 1971 arbeite ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Experimentelle und Klinische Virologie der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Berlin-Tempelhof.

Im Jahre 1962 heiratete ich meine Frau Regine geb. Gödecker. Wir haben drei Kinder.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3 12 88 85 - 3 13 81 98